

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 12 April 2001 (12.04.01)	
International application No.: PCT/JP00/06802	Applicant's or agent's file reference: H795-PCT
International filing date: 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date: 01 October 1999 (01.10.99)
Applicant: SAITO, Hiroyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

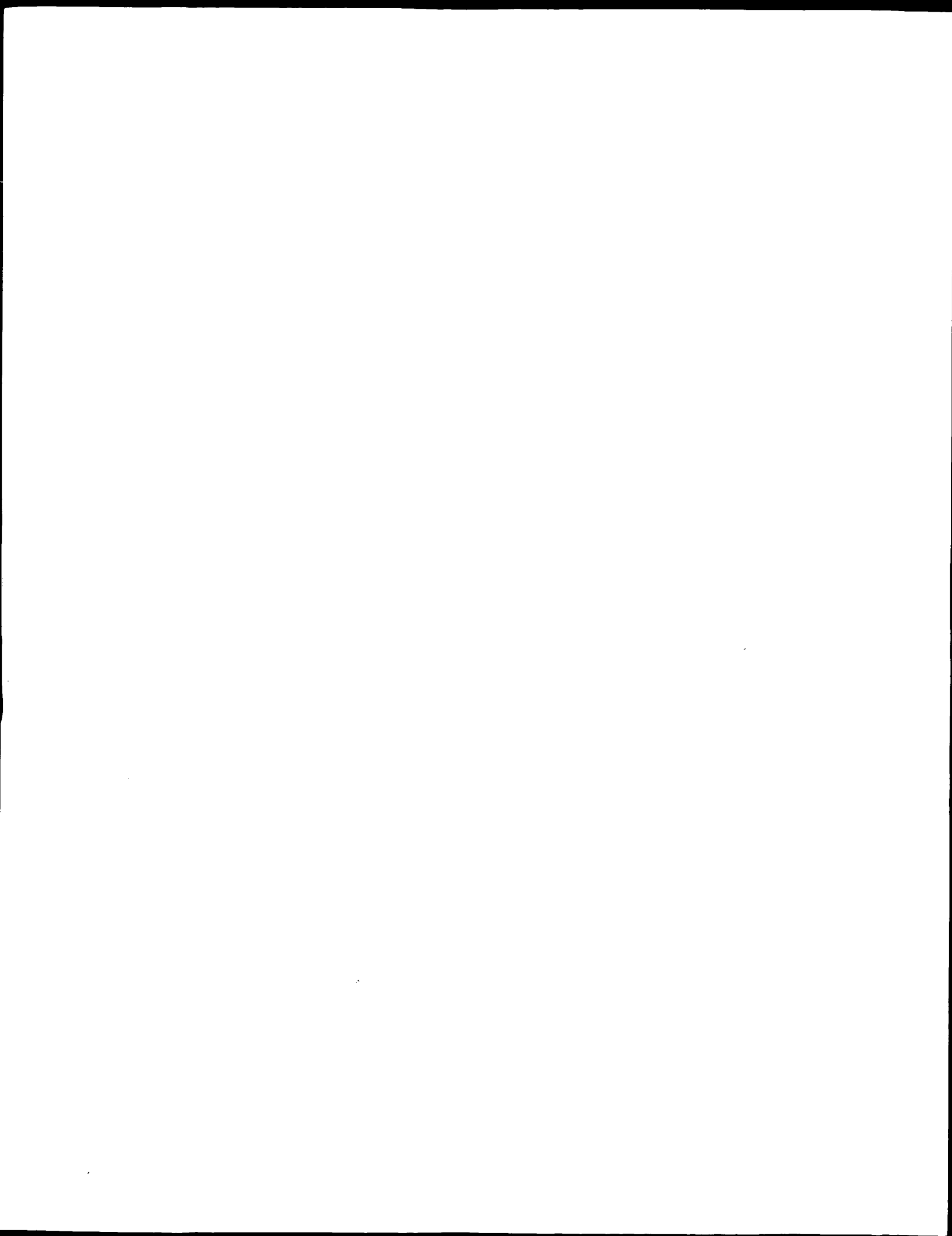
☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
27 October 2000 (27.10.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG (BIOSIS)
JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A X	Blood, Vol.92, No.11, 4167-4177, (1998)	1-8 9-53
A X	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol96, 2311-2315, (March 1999)	1-8 9-53
P,A P,X	Ketsueki Shuyouka, Vol.39, No.4, 298-302, (Oct.1999)	1-8 9-53
A X	The Journal of Cell Biology, Vol.109, 389-395, (1989)	1-8 9-53
A	Cancer Research, Vol.58, No.20, 4646-4653, (1998)	1-53
A	Cancer Chemother Pharmacol, Vol.37, No.4, 305-316, (1996)	1-53
A X	Science, Vol.275, 547-550, (1997)	1-8 9-53
A	Cell, Vol.50, No.1, 129-135, (1987)	1-53
A	US, 5346991, A (Genentech),	1-53



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
16 January, 2001 (16.01.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

E P



P

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H795-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/06802	国際出願日 (日.月.年) 29.09.00	優先日 (日.月.年) 01.10.99
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)

JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	Blood, Vol. 92, No. 11, 4167-4177, (1998)	1-8 9-53
A X	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol 96, 2311-2315, (March 1999)	1-8 9-53
P, A P, X	血液・腫瘍科 Vol. 39, No. 4, 298-302, (Oct. 1999)	1-8 9-53

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

1601.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2 B

2914

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	✓ The Journal of Cell Biology, Vol.109, 389-395, (1989)	1-8 9-53
A	✓ Cancer Research, Vol.58, No.20, 4646-4653, (1998)	1-53
A	✓ Cancer Chemother Pharmacol, Vol.37, No.4, 305-316, (1996)	1-53
A X	✓ Science, Vol.275, 547-550, (1997)	1-8 9-53
A	✓ Cell, Vol.50, No.1, 129-135, (1987)	1-53
A	✓ US, 5346991, A (Genentech) (13.09.94) 全文 &US, 5589363, A1, US, 5739101, A1	1-53
A	✓ IL, 85411, A (Genentech) (31.07.88) 全文 &EP, 278776, A2, AU, 1170588, A, JP, S63-301797, A, NZ, 223506, A ES, 2068791, T, AT, 153696, E, DE, 3855921, C, EP, 787802, A2 GR, 3024263, T	1-53
A X	✓ WO, 88/9817, A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) (15.12.88) 全文 &AU, 1948388, A, NO, 890588, A, FI, 890645, A, DK, 62589, A, FI, 892815, A0, DK, 299889, A, EP, 321526, A, NO, 892506, A, FI, 892815, A, EP, 347262, A1, JP, H2-501263, A, JP, H2-142475, A HU, 52546, A	1-8 9-53
A	✓ WO, 88/7543, A1 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) (06.10.88) 全文 &PT, 87138, A, AU, 1627488, A, FI, 885543, A, NO, 885326, A DK, 666888, A, GR, 88100198, A, EP, 309548, A, JP, H1-503438, A WO, 94/11029, A1, AU, 5671594, A, US, 5437864, A1, FI, 954347, A	1-53



4	AU-A -	001170588	.	.	4C 07H	21/04	A
5	DE-C -	003855921	.	.	6C 12N	15/12	A
6	DE-T -	000278776	.	.			
7	IL-A0-	000085411	1988.07.31		4C 12N	/	A
8	EP-A2-	000278776	1988.08.17		A 61K	37/02	
9	JP-A -	昭63-301797	1988.12.08		4C 12P	21/02	A
10	NZ-A -	000223506	1991.09.25		5C 12N	15/12	A
11	IL-A -	000085411	1994.07.31		5C 12N	15/12	A
12	ES-T -	002068791	1995.05.01		4C 12N	15/00	A
13	AT-E -	000153696	1997.06.15		6C 12N	15/12	A
14	AT-T -	000153696	1997.06.15		6C 12N	15/12	A
15	EP-A2-	000787802	1997.08.06		6C 12N	15/85	A
16	GR-T -	003024263	1997.10.31		6C 12N	15/12	A
17	DE-T -	003855921	1998.01.15		6C 12N	15/12	A

最先公知

最易読



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	The Journal of Cell Biology, Vol.109, 389-395, (1989)	1-8 9-53
A	Cancer Research, Vol. 58, No. 20, 4646-4653, (1998)	1-53
A	Cancer Chemother Pharmacol, Vol. 37, No. 4, 305-316, (1996)	1-53
A X	Science, Vol. 275, 547-550, (1997)	1-8 9-53
A	Cell, Vol. 50, No. 1, 129-135, (1987)	1-53
A	US, 5346991, A (Genentech) (13.09.94) 全文 &US, 5589363, A1 , US, 5739101, A1	1-53
A	IL, 85411, A (Genentech) (31.07.88) 全文 &EP, 278776, A2 , AU, 1170588, A , JP, S63-301797, A , NZ, 223506, A ES, 2068791, T , AT, 153696, E , DE, 3855921, C , EP, 787802, A2 GR, 3024263, T	1-53
A X	WO, 88/9817, A1 (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) (15.12.88) 全文 &AU, 1948388, A , NO, 890588, A , FI, 890645, A , DK, 62589, A , FI, 892815, A0 , DK, 299889, A , EP, 321526, A , NO, 892506, A , FI, 892815, A , EP, 347262, A1 , JP, H2-501263, A , JP, H2-142475, A HU, 52546, A	1-8 9-53
A	WO, 88/7543, A1 (SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION) (06.10.88) 全文 &PT, 87138, A , AU, 1627488, A , FI, 885543, A , NO, 885326, A DK, 666888, A , GR, 88100198, A , EP, 309548, A , JP, H1-503438, A WO, 94/11029, A1 , AU, 5671594, A , US, 5437864, A1 , FI, 954347, A	1-53

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, A61K39/395, A61P7/02, A61P9/10, C12N15/12, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DIALOG (BIOSIS)
 JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	Blood, Vol. 92, No. 11, 4167-4177, (1998)	1-8 9-53
A X	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 96, 2311-2315, (March 1999)	1-8 9-53
P, A P, X	血液・腫瘍科 Vol. 39, No. 4, 298-302, (Oct. 1999)	1-8 9-53

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

1601.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂田 誠

2B

2914

電話番号 03-3581-1101 内線 3235

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H795-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/06802	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027, A61K 39/395, A61P 7/02, 9/10, C12N 15/12, G01N 33/50, 33/15		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

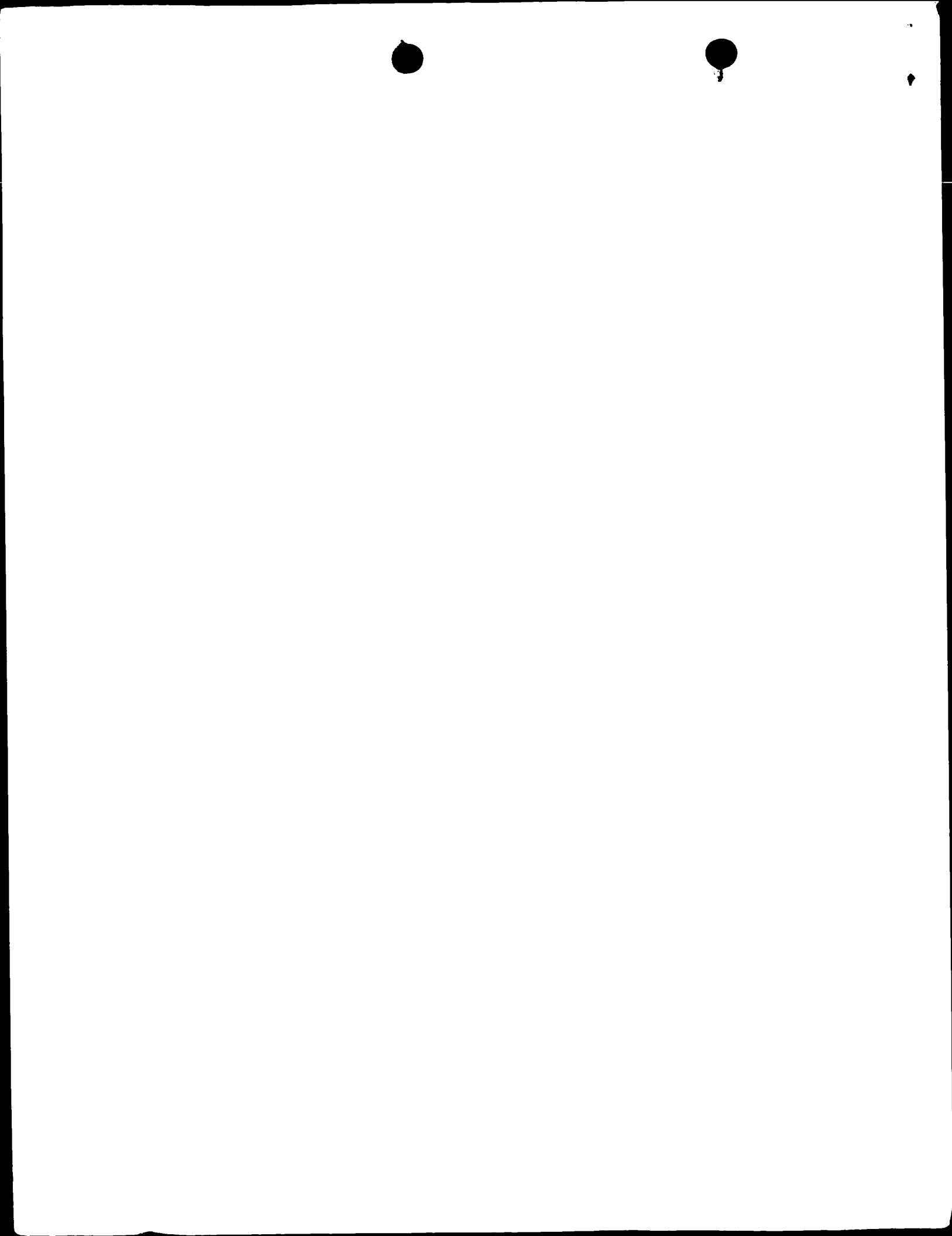
- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 October 2000 (27.10.00)	Date of completion of this report 17 July 2001 (17.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06802

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-53	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	15, 24, 33, 42, 51	YES
	Claims	1-8, 9-14, 16-23, 25-32, 34-41, 43-50, 52, 53	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-51	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-8

Document 1: Cancer Research, Vol. 58, No. 20, 4646-4653 (1998)

Document 2: Cell, Vol. 50, No. 1., pp. 129-135 (1987)

Document 3: JP, 63-301797, A

Document 4: Cancer Chemother. Pharmacol, Vol. 37, No. 4, pp. 305-316 (1996)

Document 1 indicates that TF provokes blood coagulation, and Document 2 discloses the nucleotide of a gene coding TF and the amino acid sequence coded thereby. Document 3 discloses the introduction into animal cells of TF lacking the cytoplasmic region, and the expression thereof.

Document 4 discloses grafting of ARH-77 cells into mice.

Therefore, from these documents a person skilled in the art could easily conceive of raising animal cells which express a gene coding TF, and grafting these into experimental animals. Moreover, since TF provokes blood coagulation, grafted cells would be expected to promote blood coagulation for as long as they continue to express TF, and hence the fact that the capacity to promote blood coagulation persists for a long period would be expected by a person skilled in the art and is not a surprising



advantageous effect.

Claims 9-14, 16-23, 25-32, 34-41, 43-50, 52 and 53

Document 5: JP, 1-503438, A

Document 6: JP, 8-217749, A

Document 7: Blood, Vol. 92, No. 11, pp. 4167-4177 (1998)

Document 8: Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 96, pp.
2311-2315 (1989)

Document 9: The Journal of Cell Biology, Vol. 109, pp.
389-395 (1989)

Document 10: Science, Vol. 275, pp. 547-550 (1997)

Document 5 discloses a monoclonal antibody against TF; and Document 6 discloses a method for constructing a humanized antibody.

Documents 7, 8, 9 and 10 discloses inhibition of blood coagulation by administration of antibodies against TF.

Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of using an anti-TF antibody to prevent or treat conditions associated with accelerated blood coagulation, and this does not involve an inventive step.

Claims 15, 24, 33, 42 and 51

No document, including those cited in the international search report, discloses or suggests a version b-b, i-b or i-2b humanized antibody.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月12日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/24626 A1

(51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, A61K 39/395, A61P 7/02, 9/10, C12N 15/12, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06802

(22) 国際出願日: 2000年9月29日 (29.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/281843 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP
特願平11/282120 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP
特願平11/282134 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP
特願平11/282167 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP
特願平11/282188 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP
特願平11/282192 ✓ 1999年10月1日 (01.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 斉藤浩之 (SAITO, Hiroyuki) [JP/JP]. 北沢剛久 (KITAZAWA, Takehisa) [JP/JP]. 吉橋一隆 (YOSHIHASHI, Kazutaka) [JP/JP]. 服部有宏 (HATTORI, Kunihiro) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PREVENTION AND TREATMENT OF DISEASES ASSOCIATED WITH BLOOD COAGULATION

(54) 発明の名称: 血液凝固関連疾患の予防及び治療

(57) Abstract: An animal which has been kept in the state of the sustained acceleration of blood coagulation by continuously feeding thereto human tissue factor by transplanting cells having human tissue factor gene transferred thereinto (for example, tumor cells) to an experimental animal such as a mouse and proliferating therein. This model animal is useful in, for example, search and development of remedies for diseases associated with the sustained acceleration of blood coagulation. Preventives or remedies for diseases associated with the sustained acceleration of blood coagulation, the state with the acceleration of blood coagulation caused by infection, venous thrombosis, arterial thrombosis and diseases caused by vascular medial thickening which contain as the active ingredient an antibody against human tissue factor (human TF).

(57) 要約:

ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞、例えば腫瘍細胞を、マウスなどの実験動物に移植して増殖させることにより、ヒト組織因子を持続的に該実験動物に供給することによって、血液凝固亢進状態が持続している動物を提供する。この動物モデルは、血液凝固亢進状態が持続する疾患の治療剤の開発研究などに有用である。

本発明はさらに、ヒト組織因子 (ヒトTF) に対する抗体を有効成分とする、血液凝固亢進状態が持続している疾患、感染症に起因する血液凝固亢進状態、静脈血栓症、動脈血栓症、及び血管中膜肥厚に起因する疾患の、予防又は治療剤を提供する。

WO 01/24626 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

血液凝固関連疾患の予防及び治療

発明の分野

本発明は、持続的血液凝固亢進動物モデル及びその作製方法、血液凝固亢進状態が継続している疾患の予防又は治療剤、感染症に起因する血液凝固亢進状態の予防又は治療剤、静脈又は動脈の血栓症の予防又は治療剤、及び血管中膜肥厚に起因する、疾患の予防又は治療剤に関する。

背景技術

血液凝固反応はセリンプロテアーゼ前駆体が次々に活性型プロテアーゼにより活性化されて、最終的にトロンビンが生成することでフィブリンが形成される反応である。血栓症は、各種の病的状態の進展に伴い血漿中の凝固・線溶系の変化、血小板や白血球、血管内皮細胞の機能が変化することで血液凝固反応が開始され過剰に亢進した結果として生じる。血液凝固反応の開始因子が組織因子である。急性心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠動脈症候群では、動脈硬化が進展した結果生じたプラーク内に多く存在する組織因子がプラークの破綻にともなって血液に露出することで血液凝固反応が開始される。

また、敗血症や悪性腫瘍に随伴して生じる播種性血管内凝固症候群では、活性化された単球やマクロファージなどが組織因子を発現したり腫瘍細胞が組織因子を発現することで血液凝固反応を亢進させている。一旦、組織因子が血液に接触すると血液凝固反応は短時間の内に進み血栓を生成する。従って、血栓形成を予防するために

は何時開始されるか分からない、あるいは常に生じている血液凝固反応を阻止する必要がある。従って、有効な抗血栓薬の開発には、持続的に凝固亢進状態を示す実験モデルが不可欠である。しかしながら、一般に知られている血栓モデルはいずれも短時間で血栓形成を誘発するモデルである。

そこで、本発明は1つの観点において、ヒト組織因子を持続的に血液に接触させることで凝固亢進状態が持続する実験モデルを提供しようとするものである。

血液凝固反応はセリンプロテアーゼ前駆体が次々に活性型プロテアーゼにより活性化されて、最終的にトロンビンが生成することでフィブリンが形成される反応である。血栓症は、各種の病的状態の進展に伴い血漿中の凝固・線溶系の変化、血小板や白血球、血管内皮細胞の機能が変化することで血液凝固反応が開始され過剰に亢進した結果として生じる。血液凝固反応の開始因子が組織因子(TF)である。

急性心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠動脈症候群では、動脈硬化が進展した結果生じたプラーク内に多く存在するTFがプラークの破綻にともなって血液に露出することで血液凝固反応が開始される。また、敗血症や悪性腫瘍に随伴して生じる播種性血管内凝固症候群では、活性化された単球やマクロファージなどがTFを発現したり腫瘍細胞がTFを発現することで血液凝固反応を亢進させており、これが持続する。一旦、TFが血液に接触すると血液凝固反応は短時間の内に進み血栓を生成する。従って、血栓形成を予防するためには何時開始されるか分からない、あるいは常に生じている血液凝固反応を阻止する必要がある。従って、有効な抗血栓薬としては、血液凝固亢進状態の持続を阻止する医薬が必要である。

従って本発明は、第2の観点において、血液凝固状態が持続して

いる疾患の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

重症感染症にはしばしば凝固異常症が伴い、多臓器不全や播種性血管内凝固症候群のような症状を引き起こし、患者の予後を悪化させる要因としてその対策が重要とされている。重症感染症、なかでも敗血症のような全身感染症においては、臓器障害の発生機序として、血管内皮細胞の障害が考えられている。敗血症、とくにグラム陰性菌敗血症ではその菌体成分であるリポポリサッカライド（LPS）が重要な役割を演じている。

血液中に遊離したLPSは、単球を活性化して組織因子（TF）を産生させることで凝固亢進状態を引き起こすとともに、TNFやIL-1 β 、IL-8などのサイトカインを産生・放出させることで好中球や血管内皮細胞を活性化する。活性化された好中球は血管内皮細胞に接着して活性酵素やエラスターゼなどの細胞傷害物質を放出して血管内皮細胞を傷害する。サイトカインで活性化され、また好中球により傷害された血管内皮細胞ではTFの産生が高まり凝固亢進状態はさらに進行する。その結果、全身で微小血栓が多発し、臓器の循環不全が誘発されることで多臓器不全へと進展する。

このため、感染症に起因する血液凝固状態の予防又は治療剤の開発が望まれている。

従って本発明は、第3の観点において、感染症に起因する血液凝固状態の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

静脈血栓が発症する機序として、静脈血流の遅滞、静脈壁の損傷および血液凝固能の亢進が重要と考えられている。特に、手術や分娩、外傷などの侵襲は血管壁への物理的損傷や凝固・線溶系の異常を招き、術後の臥床は静脈血流の遅滞をもたらす。その結果生じた静脈血栓は四肢の循環不全を来すのみならず、血栓そのものが血流に乗って肺動脈に流入することで致死的な肺塞栓症を来すため、静

脈血栓症そのものの予防が重要とされている。そこで、静脈血栓を有効に予防又は治療できる医薬の開発が望まれている。

従って本発明は、第4の観点において、静脈血栓症の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

動脈血栓症は硬化が進展した血管に血栓が生じる疾患であり、脳や心臓などの重要な臓器で発症するとしばしば致命的となる。特に、不安定狭心症や急性心筋梗塞などの冠動脈症候群は、突然死に移行しやすい危険な病態と考えられている。最近はその発症機序として動脈硬化プラークの破綻とそれに伴う血栓形成が重要な要因であることが明らかとなってきた。

さらに、血栓形成の開始因子である組織因子(TF)がプラーク内の細胞表面や細胞外間質に過剰に発現されていることが明らかとなり、プラークの破綻に伴う組織因子(TF)の血液への露出が血栓形成の主要な要因であると考えられている。

このため、動脈血栓症の予防又は治療のための新規な医薬の開発が望まれている。

従って本発明は、第5の観点において、動脈血栓症の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

経皮的冠動脈形成術(PTCA)は虚血性心疾患の治療法として重要な位置を占めているが、処置後数ヶ月以降に発生する再狭窄がこの治療法の有用性を阻害し、問題となっている。再狭窄の成因として内皮細胞の傷害に起因した急性期、亜急性期の血栓形成の重要性が明らかとなってきている。傷害を受けた内皮細胞や内皮下組織の平滑筋細胞、線維芽細胞などが発現する組織因子(TF)の血液との接触が血栓形成には重要である。生じた血栓を覆うように新たに血管壁の細胞が増生し、血管内腔面積を狭小化する。また、血管組織自体の増生と血管径の収縮も血管内腔面積の狭小化には重要で

あり、これらが再狭窄の直接の要因となる。そして、再狭窄を有効に予防又は治療することができる医薬が求められている。

従って本発明は、第6の観点において、血管中膜肥厚に起因する疾患の新規な予防又は治療剤を提供しようとするものである。

発明の開示

本発明者らは、前記第1の課題を解決すべく種々検討を行った結果、ヒト組織因子(TF)遺伝子を導入することによりヒト組織因子を恒常的に発現することができる動物細胞を実験動物に移植して動物中のヒト組織因子濃度を上昇せしめることにより、該動物における血液凝固亢進状態を長期間維持することができることを見出し、本発明を完成した。

従って本発明は第1の観点において、ヒト組織因子(TF)又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されていて該遺伝子を発現することができる動物細胞が移植されている実験動物であって、血液凝固亢進状態が長期間持続する非ヒト動物を提供する。

前記ヒト組織因子の一部分は、例えば細胞内領域を欠くヒト組織因子である。前記動物細胞は好ましくは哺乳動物細胞である。前記哺乳動物細胞は好ましくはヒト骨髓腫細胞である。前記動物は、好ましくはマウスである。前記血液凝固亢進状態は、ヒト組織因子血中濃度の上昇、血小板の減少、フィブリノーゲンの減少、可溶性フィブリンモノマー複合体濃度の上昇及びトロンビン-アンチトロンビンIII複合体濃度の上昇の少なくとも1つの現象により表わされる。

本発明はまた、上記の動物の作製方法において、ヒト組織因子(TF)又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されており該遺伝子を発現することができる動物細胞を非ヒト実験動物に移植し、そ

して血液凝固亢進状態が持続する動物を選択することを特徴とする方法を提供する。

本発明はまた、上記の動物を用いることを特徴とする抗血栓薬のスクリーニング方法を提供する。

前記第2の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、血液凝固亢進状態の持続を阻止することができることを見出した。

従って、本発明は、第2の観点において、ヒト組織因子（ヒトTF）に対する抗体を含んで成る、血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤を提供する。

前記抗体は、例えばポリクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくは組換え型抗体である。前記抗体は、好ましくは改変抗体である。前記改変抗体は、好ましくはキメラ抗体又はヒト型化抗体である。前記ヒト型化抗体は、好ましくはバージョンb-b, i-b、又はi-b₂のヒト型化抗体である。前記抗体は、例えば抗体修飾物である。前記抗体修飾物は、例えば抗体断片Fab, F(ab')₂、もしくはFv、又はシングルチェーンFv（scFv）である。

前記第3の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、感染症に起因する血液凝固亢進状態を予防又は治療することができることを見出した。

従って、本発明は、第3の観点において、ヒト組織因子（ヒトTF）に対する抗体を含んで成る、感染症に起因する血液凝固亢進状態の予防又は治療剤を提供する。

前記抗体は、例えばポリクローナル抗体である。前記抗体は、好

ましくはモノクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくは組換え型抗体である。前記抗体は、好ましくは改変抗体である。前記改変抗体は、好ましくはキメラ抗体又はヒト型化抗体である。前記ヒト型化抗体は、好ましくはバージョンb-b, i-b、又はi-b₂のヒト型化抗体である。前記抗体は、例えば抗体修飾物である。前記抗体修飾物は、例えば抗体断片Fab, F(ab')₂もしくはFv、又はシングルチェーンFv(scFv)である。

前記第4の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、静脈血栓症を予防又は治療することができることを見出した。

従って、本発明は、第4の観点において、ヒト組織因子（ヒトTF）に対する抗体を含んで成る、静脈血栓症の予防又は治療剤を提供する。

前記抗体は、例えばポリクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくは組換え型抗体である。前記抗体は、好ましくは改変抗体である。前記改変抗体は、好ましくはキメラ抗体又はヒト型化抗体である。前記ヒト型化抗体は、好ましくはバージョンb-b, i-b、又はi-b₂のヒト型化抗体である。前記抗体は、例えば抗体修飾物である。前記抗体修飾物は、例えば抗体断片Fab, F(ab')₂もしくはFv、又はシングルチェーンFv(scFv)である。

前記第5の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒトTF抗体、又は抗TF抗体と称する場合がある）により、動脈血栓症を予防又は治療することができることを見出した。

従って、本発明は、第5の観点において、ヒト組織因子（ヒトT

F) に対する抗体を含んで成る、動脈血栓症の予防又は治療剤を提供する。

前記抗体は、例えばポリクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくは組換え型抗体である。前記抗体は、好ましくは改変抗体である。前記改変抗体は、好ましくはキメラ抗体又はヒト型化抗体である。前記ヒト型化抗体は、好ましくはバージョン b - b, i - b、又は i - b₂ のヒト型化抗体である。前記抗体は、例えば抗体修飾物である。前記抗体修飾物は、例えば抗体断片 F a b, F (a b')₂、もしくは F v、又はシングルチェーン F v (s c F v) である。

前記第 6 の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明者らは、ヒト組織因子に対する抗体（抗ヒト T F 抗体、又は抗 T F 抗体と称する場合がある）により、血管中膜肥厚に起因する疾患を予防又は治療することができることを見出した。

従って、本発明は、第 6 の観点において、ヒト組織因子（ヒト T F）に対する抗体を含んで成る、血管中膜肥厚に起因する疾患の予防又は治療剤を提供する。

前記抗体は、例えばポリクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。前記抗体は、好ましくは組換え型抗体である。前記抗体は、好ましくは改変抗体である。前記改変抗体は、好ましくはキメラ抗体又はヒト型化抗体である。前記ヒト型化抗体は、好ましくはバージョン b - b, i - b、又は i - b₂ のヒト型化抗体である。前記抗体は、例えば抗体修飾物である。前記抗体修飾物は、例えば抗体断片 F a b, F (a b')₂、もしくは F v、又はシングルチェーン F v (s c F v) である。

図面の簡単な説明

図 1 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の抗原結合活性を比較したグラフである。

図 2 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F によるファクター X a 産生阻害活性）を比較したグラフである。

図 3 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（ファクター X 結合阻害活性）を比較したグラフである。

図 4 は、H 鎖キメラ／L 鎖キメラ抗体、H 鎖ヒト型化バージョン b／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 抗体、及び H 鎖ヒト型化バージョン i／L 鎖ヒト型化バージョン b 2 抗体の、ヒト T F に対する中和活性（T F による血漿凝固阻害活性）を比較したグラフである。

図 5 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における腫瘍体積の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

図 6 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（

実線)における、ヒト組織因子の血漿中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

図 7 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス(点線)及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス(実線)における、血小板の数の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

図 8 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス(点線)及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス(実線)における、フィブリノーゲンの血漿中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を、腫瘍細胞を移植していない対照マウス(N o r m a l)におけるフィブリノーゲンの濃度を 1 0 0 %とした相対値として示すグラフである。

図 9 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス(点線)及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス(実線)における、可溶性フィブリンモノマー複合体(s F M C)の血漿中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

図 1 0 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス(点線)及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス(実線)における、トロンビン-アンチトロンビンIII 複合体(T A T)の血漿中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

図 1 1 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週1回、3週間にわたって投与した場合の血小板数の経時的変化を示すグラフである。

図 1 2 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週1回、3週間にわたって投与した場合の、最終投与の6日後のフィブリンモノマー複合体

(sFMC) の血漿中濃度を示すグラフである。

図 1 3 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植45日目から抗ヒトTF抗体を1mg/kgで週 1 回、3 週間にわたって投与した場合の、最終投与の 6 日後のトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体 (TAT) の血漿中濃度を示すグラフである。

図 1 4 は、ヒトTF遺伝子を導入した腫瘍細胞を移植したマウスに、移植49日目に抗ヒトTF抗体1mg/kgを単回投与、または低分子量ヘパリン601.5 IU/kg, 1900.3 IU/kg, 6487.3 IU/kgを浸透圧ポンプで24時間持続投与した場合の、血小板数の経時的変化を示すグラフである。

発明の実施の形態

第 1 の観点の本発明において使用するためのヒト組織因子 (TF) をコードする遺伝子はすでにクローニングされており、その塩基配列及びそれによりコードされるアミノ酸配列も知られている (H. Morrisseyら、Cell, Vol. 50, p.129-135 (1987))。全長ヒト組織因子をコードする塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号: 103 及び 104 に示す。本発明においては、例えば細胞内領域が除去されたTFをコードする遺伝子でもよく、また血液凝固系を開始する活性を維持している部分をコードする遺伝子でもよい。

この遺伝子を動物細胞に導入し発現せしめるためのベクターとしては、動物細胞において機能する任意の発現ベクターを使用することができ、例えば pCOS1, pSV2-neo, pMAM-neo, pSG5 などを用いることができる。本発明では哺乳類細胞で常用される有用なプロモーター、ヒトTF遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えば、プロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロ

ウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) や、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター、あるいはヒトエロンゲーションファクター 1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。発現ベクターには複製起源として、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス等の由来のものを用いることができ、さらに選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼ A P H (3') II または I (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

また、細胞への遺伝子導入方法は、エレクトロポレーション法その他、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。この発現ベクターを導入するための細胞としては、実験動物に移植可能なものであれば特に限定されない。このためには種々の培養細胞を使用することができ、例えば哺乳類細胞、例えばヒト、マウス、ラット、ハムスター、モンキー等由来の培養細胞、特に腫瘍細胞が好ましい。細胞の具体例としては、K P M M 2, A R H - 7 7 などのヒト骨髓腫細胞株、P 8 1 5, P 3 8 8, L 1 2 1 0 などのマウス白血病細胞株等が使用できる。

本発明において使用する実験動物は、ヒト以外の哺乳類であり、好ましくは実験用小動物、例えばマウス、ラット、ハムスター等であり、マウスが特に好ましい。

第 2 の観点の本発明において、血液凝固亢進状態とは、ヒト T F により惹起される身体状態であって、例えば、血小板数やフィブリノーゲン濃度の低下、可溶性フィブリンモノマー複合体 (s F M C) やトロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (T A T) 濃度の上

昇などの状態として現われる。

本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンFvなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

第3の観点の本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンFvなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

第4の観点の本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンFvなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

第5の観点の本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基くキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンFvなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

第6の観点の本発明において使用する抗体としては、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止することができる抗体であれば

ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。また、モノクローナル抗体に基づくキメラ抗体、ヒト型化抗体、シングルチェーンF_vなどを使用することもできる。ヒト型化抗体が特に好ましい。

1. 抗ヒトTF抗体

本発明で使用する抗ヒトTF抗体は、ヒトTFに基く血液凝固亢進状態の持続を阻止する効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。

本発明で使用する抗ヒトTF抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用する抗ヒトTF抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はヒトTFと結合することにより、ヒトTFが血液凝固亢進の状態を惹起するのを阻害する抗体である。

2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、ヒトTF又はその一部分（断片）を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトTFを、J. H. Mo

rrissey ら、Cell, Vol. 50, p. 129-135 (1987) に開示されたヒト T F 遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、ヒト T F をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒト T F タンパク質を公知の方法で精製する。この方法を、本明細書の参考例 1 に記載する。さらに、抗原として使用するヒト T F は参考例 2 に記載する方法によりヒト胎盤などの T F 含有生物材料から抽出、精製して使用することもできる。

次に、この精製ヒト T F タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、ヒト T F の C-末端側の膜貫通領域を除去した可溶性 T F を例えば遺伝子組換えにより作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を P B S (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントやフロイント不完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられ

る。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653)(Kearney, J.F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Yelton, D.E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St. Groth, S.F. and Scheidegger, D.J., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養

液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37℃ 程度に加温した PEG 溶液 (例えば平均分子量 1000-6000 程度) を通常 30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、数日~数週間) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でヒト TF に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、ヒト TF への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平 1-59878 号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てまたは一部のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるヒト TF を投与して抗ヒト TF 抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からヒト TF に対するヒト抗体を取得してもよい (国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照)。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

モノクローナル抗体の製造の例を参考例 2 に具体的に記載する。この例においては、A T R - 2 , 3 , 4 , 5 , 7 及び 8 と称する 6 種類のモノクローナル抗体を得ており、いずれも本発明において使用することができるが、A T R - 5 が特に好ましい。

3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A.M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 参照）。

具体的には、抗ヒト T F 抗体を産生するハイブリドーマから、抗ヒト T F 抗体の可変 (V) 領域をコードする m R N A を単離する。m R N A の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、A G P C 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により行って全 R N A を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用して目的の m R N A を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用い

ることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5' -AmplifINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5' -RACE 法 (Frohman, M.A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。

目的とする抗ヒト TF 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用する抗ヒト TF 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質（ヤギ β カゼインなど）をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

組換え抗体の製造方法の一例を参考例 3 に具体的に記載する。

4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR；complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換

え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 1 250 23号公報、WO 96/02576号公報参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region; FR）とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する（WO 98/13388号公報に記載の方法を参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4を、L鎖ではC κ , C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

キメラ抗体の作製方法は参考例4に具体的に記載する。

また、ヒト型化抗体の作製方法を参考例5に具体的に記載する。

この参考例においては、ヒト型化重鎖（H鎖）可変領域（V領域）として、表1及び表2に示すアミノ酸配列を有するバージョンa, b, c, d, e, f, g, h, i, j, b1, d1, b3及びd3を用いた。

表 1

H鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1			CDR1	FR2	CDR2		
	1	2	3		4	5	6	
L39130(a)	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	12345	67890123456789	012A3456789	012A3456789	012345	
Z34963(b)	QVQLLESCAVLARPGTSVKISCKASGFNIK	DYYMH	WVKQRPQG	GLEWIG	GNDPANGHSMYDPK	FPQG		
M30885(c)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M62723(d)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Z80844(e)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
L04345(f)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S78322(g)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Z26827(h)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
U95239(i)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
L03147(j)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P01742(b1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P01742(d1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Z80844(b3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Z80844(d3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

表 2

H鎖V領域のアミノ酸配列(表1の続き)

	FR3			CDR3	FR4
	7	8	9	10	11
L39130(a)	67890123456789012ABC345678901234	56789012	345678901234	56789012	34567890123
Z34963(b)	RAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCAR	DSGYAMDY	WGQGLTVTVSS		
M30885(c)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
M62723(d)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T--				
Z80844(e)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
L04345(f)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F--				
S78322(g)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T--				
Z26827(h)	K-T--DE-S-T--MQL--RS--S--				
U95239(i)	-VTMS-DK-S-A--QWT--KAS-T-I-F--				
L03147(j)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T--				
P01742(b1)	-VTF--D--NT--M-LR--RSA-T--				
P01742(d1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
Z80844(b3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				
Z80844(d3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I--				
	-VTI--DE-T-T--M-L--RS--F--				

また、ヒト型化軽鎖（L鎖）V領域として、表3に示すアミノ酸配列を有するバージョンa, b, c, b1及びb2を用いた。

表 3

L鎖V領域のアミノ酸配列

	FR1		CDR1	FR2	CDR2
	1	2	3	4	5
	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD	
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----
S65921(b1)	-----	-----	-F-----S--T--	-----	-----
X93625(b2)	-----	-----	-----E--S--	-----	-----

	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	10
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567		
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHGESP	YTFGGGTKVEIK		
S68699(b)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----
P01607(c)	-----Y-----I-----	-----	-----	-----	-----
S65921(b1)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----
X93625(b2)	-----Y-----	-----	-----	-----	-----

そして、上記のH鎖V領域の種々のバージョンと、L鎖V領域の種々のバージョンを組合わせて抗原結合能、及びTF中和活性について評価した結果、参考例6及び参考例7に記載する通り、「H鎖V領域バージョン」-「L鎖V領域バージョン」として表示する場合「b-b」、「i-b」、及び「i-b2」が特に高活性を示した。なお、これらのヒト型化抗体の抗原結合能を図1に示し、ヒト

T F 中和活性 (T F によるファクター X a 産生阻害活性) を図 2 に示し、ヒト T F 中和活性 (ファクター X 結合阻害活性) を図 3 に示し、そしてヒト T F 中和活性 (T F による血漿凝固阻害活性) を図 4 に示す。

5. 抗体修飾物

本発明で使用する抗体は、ヒト T F に結合し、ヒト T F の活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、F a b, F (a b')₂, F v、または H 鎖若しくは L 鎖の F v を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン F v (s c F v) が挙げられる。

具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これらの抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

s c F v は、抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域とを連結することにより得られる。この s c F v において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域は、リンカー、好ましくはペプチドリinker を介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。s c F v における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリinker としては、例えばアミノ酸 1 2

— 19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

s c F v をコードする D N A は、前記抗体の H 鎖または H 鎖 V 領域をコードする D N A、および L 鎖または L 鎖 V 領域をコードする D N A のうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードする D N A 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて P C R 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードする D N A、およびその両端が各々 H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせ増幅することにより得られる。

また、一旦 s c F v をコードする D N A が作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従って s c F v を得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (P E G) 等の各種分子と結合した抗ヒト T F 抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモ

ーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター 1 α (HEF 1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108-114) により、また、HEF 1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えば lacZ プロモーター、araB プロモーターを挙げることができる。lacZ プロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいは araB プロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pepB シグナル配列 (Lei, S.P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV40、ポリオマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Eco g p t）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素（d h f r）遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの真菌細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞を*in vitro*または*in vivo*で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia 製) 等が挙げられる。その他、通常の

タンパク質で使われている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

8-1. 血液凝固亢進状態の持続の阻止作用の測定

本発明の血液凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療の薬効の試験には、新規な動物モデル系が必要であり、この評価方法の詳細は、本件と同一出願人の「持続的血液凝固亢進動物モデル及びその作製方法」と題する特許出願の明細書に記載されている。その評価方法の具体例を本件明細書に実施例1として記載する。

また、上記のヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」を用いた結果を実施例2及び図11～13に示す。この実験においては、実施例1に示す動物モデル系において、ヒトTF遺伝子を含有する腫瘍細胞を移植したマウスの血小板数が該腫瘍細胞を移植しなかったマウスの血小板数に比べて約半分に減少した後（移植後5～6週間）1mg/kgのヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」を1週間に1回静脈内に反復投与したところ、投与開始後3週間で実験を終了するまで、血小板数は腫瘍を移植しなかったマウスの血小板数レベルに維持された。

また、本発明のヒト型化抗ヒトTF抗体の投与により可溶性フィブリンモノマー複合体（sFMC）及びトロンビン-アンチトロンビンIII複合体（TAT）濃度の上昇が抑制された。この結果、本発明の抗ヒトTF抗体の投与により血液凝固亢進状態の持続が阻止され、正常な状態が維持されることが確認された。

8-2. 感染症に起因する血液凝固亢進状態の治療効果の確認

血液凝固亢進状態は、プロトロンビン時間の延長、血漿中フィブリノーゲン濃度の低下、血清中フィブリン分解産物濃度の上昇などにより観察することができる。L P S の投与によりプロトロンビン時間の延長、血漿中フィブリノーゲン濃度の低下、及び血清中フィブリン分解産物濃度の上昇が生じるが、本発明の抗ヒト T F 抗体の投与によりそれらは抑制された。従って、本発明の抗ヒト T F 抗体は、感染症に起因する血液凝固亢進状態の予防又は治療に有効であることが確認された。

この効果を、実施例 3 に具体的に記載する。

8-3. 静脈血栓の予防・治療効果の確認

本発明の抗ヒト T F 抗体が静脈血栓の予防・治療効果を有することを、実施例 4 において具体的に記載する。

8-4. 動脈血栓症の予防・治療効果の確認

本発明の抗ヒト T F 抗体が動脈血栓症の予防・治療効果を有することを、実施例 5 において具体的に記載する。

8-5. 血管中膜肥厚に起因する疾患の予防・治療効果の確認

本発明の抗ヒト T F 抗体が血管中膜肥厚に起因する疾患の予防・治療効果を有することを、実施例 6 において具体的に記載する。

9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、血液凝固亢進状態が持続する疾患、感染症に起因する血液凝固亢進状態、静脈血栓症、動脈血栓症、及び血管中膜の肥厚に起因する疾患の予防、治療又は改善を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重 1 kg あたり 0. 0 0 1 mg から 1 0 0 0 mg の範囲で選ばれる。あるいは、0. 0 1 ~ 1 0 0 mg / kg、好ましくは 0. 1 ~ 1 0 mg / kg の投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗ヒト T F 抗体を含有する治療剤はこれらの投与

量に制限されるものではない。

投与方法は特に限定されないが、静脈注射、点滴静脈注射等が好ましい。

本発明の抗ヒトTF抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton,

米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗ヒトTF抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えば Tween 80, Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤とし

ては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

実施例

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1. 実験用マウスの作製

ヒト組織因子をコードする遺伝子（配列番号：103）を動物細胞用発現ベクター pCOS1 に挿入したベクター（hTF-pCOS1）を制限酵素 P r u I で消化し、直鎖にしたものをヒト骨髓腫細胞株 K P M M 2（F E R M P-14170）にエレクトロポレーションにより導入した。

なお、pCOS1 は H E F-P M h-g γ 1（W O 9 2 / 1 9 7 5 9 参照）から、E c o R 1 および S m a 1 消化により抗体遺伝子を削除し、E c o R 1-N o t I-B a m H 1 A d a p t o r（宝酒造）を連結することにより構築した。これを、1 mg/mL の G 4 1 8 を含有する R P M I 1 6 4 0（20% F C S h I L-6 : 4 n g / m l 含有）培地に培養し、増殖してきた細胞について、抗ヒト組織因子抗体（A m e r i c a n D i a g n o s t i c a）を用いて、ヒト組織因子を発現する細胞をフローサイトメトリーにより確認した。これにより、ヒト組織因子遺伝子を導入した細胞株 K P M M 2 / T F 2 2 6 を得た。

前記ヒト組織因子遺伝子を導入する前の親株（K P M M 2 / p a r e n t）及び遺伝子を挿入した株 K P M M 2 / T F 2 2 6 を、4 n g / m L のヒト I L-6 及び 20% ウシ胎児血清を含む R P M I-1 6 4 0 において培養した。こうして増殖させた K P M M 2 / T F 2 2 6 細胞及び親株 K P M M 2 / p a r e n t 細胞を別々の S C I D マウス（入手先：日本クレア、雄、7 週齢、体重平均約 22 g）の

側腹部の皮下に 1×10^7 個移植し、経時的に腫瘍体種、血液中の血小板数、血漿中のヒト組織因子濃度、フィブリノーゲン濃度、可溶性フィブリンモノマー複合体 (s F M C) 濃度、及びトロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (T A T) 濃度の変化を調べた。

この結果、図 5 に示す通り、いずれのマウスにおいても腫瘍体積は経時的に増加した。しかしながら、図 6 に示す通り、ヒト組織因子の血漿中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇したが該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては全く上昇しなかった。また、図 7 及び図 8 に示す通り、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、それぞれ血小板及びフィブリノーゲンが経時的に減少し、これらの血液凝固成分が消耗されたことが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、これらの血液凝固成分の減少（消耗）は生じなかった。

また、図 9 及び図 10 に示す通り、それぞれ可溶性フィブリンモノマー複合体 (s F M C) 及びトロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (T A T) の血漿中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇し、血液凝固亢進状態が進行していることが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、前記の血液凝固-関連成分濃度の上昇は見られなかった。

以上の結果、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、血液凝固亢進状態が長期間持続していることが確認され、本発明の動物が、持続的凝固亢進モデル動物として有用であることが確認された。

実施例 2.

実施例 1 に記載のモデルにおけるヒト型化抗ヒト T F 抗体バージョン「i-b 2」の効果を検討した。K P M M 2 / T F 2 2 6 を S C I D マウス（日本クレア、雄、7 週齢、体重平均約 22 g）に移植した 5 ～ 6 週間後に血小板数が腫瘍非移植群の約半分ぐらいになり、凝固亢進状態の持続が確認されたので、移植後 4 5 日後より 1 mg/kg のヒト型化抗ヒト T F 抗体バージョン「i-b 2」を 1 週間に 1 回静脈内投与した。その結果、ヒト型化抗ヒト T F 抗体バージョン「i-b 2」投与の 3 日後には血小板数は腫瘍非移植群以上にまで回復し、投与開始から実験を終了した 3 週間目までの間、血小板数は腫瘍非移植群のレベルを維持した（図 1 1）。

また、3 回目のヒト型化抗ヒト T F 抗体バージョン「i-b 2」投与の 6 日目に血漿中の可溶性フィブリンモノマー複合体（s F M C）濃度およびトロンビン-アンチトロンビン III 複合体（T A T）濃度を測定したところ、抗体投与によりこれらの上昇は抑制されていた（図 1 2 および図 1 3）。これらの結果から、ヒト型化抗ヒト T F 抗体バージョン「i-b 2」は凝固亢進状態が長期間持続するモデルにおいて、週 1 回の投与で凝固状態を安定して正常レベルに維持する作用を有していた。

実施例 3.

イソフルラン麻酔下のカニクイザル（中華人民共和国・南寧・広西霊長類実験動物研究センターより輸入、雌雄半々、推定年齢 5-7 歳、体重 2.99-5.81 kg）に生理食塩水にて溶解した LPS を 1 mg/kg/hr（2 ml/kg/hr）の用量で 6 時間静脈内に持続注入した。ヒト型化抗ヒト T F 抗体投与群の個体にはヒト型化抗ヒト T F 抗体「バージョン i-b2」を 0.3 mg/kg（1 ml/kg）、対照群の個体には溶媒（20 mM sodium acetate/ 150 mM NaCl, pH 6.0）を 1 ml/kg、それぞれ LPS 持続注入開始の 10 分前に静脈内投与した。

LPS持続注入終了時に大腿動脈に装着しておいたカテーテルよりクエン酸採血及び通常採血を行い、プロトロンビン時間、血漿中フィブリノーゲン濃度、血清中フィブリン分解産物濃度を測定した。その結果、表4のようにLPS注入によりプロトロンビン時間は延長し、血漿中フィブリノーゲン濃度は減少、血清中フィブリン分解産物濃度は上昇し、血液凝固亢進状態が惹起されたが、ヒト型化抗ヒトTF抗体「バージョンi-b2」を投与しておいた群ではこれらの変化は強く抑制された。このことから、ヒト型化抗ヒトTF抗体「バージョンi-b2」は感染症に由来する凝固亢進状態を抑制できることが明らかとなった。

表 4

LPS注入による血液凝固亢進に対するヒト型化抗ヒトTF抗体の効果

	対 照 群 (n = 4)		ヒト型化抗ヒトTF抗体 投与群 (n = 4)	
	LPS注入前	LPS注入後	LPS注入前	LPS注入後
プロトロンビン 時間 (秒)	11.1±0.3	15.8±2.3	10.9±0.3	11.7±0.6
血漿中フィブリノ ーゲン濃度 (mg/dl)	150±20	90±20	170±10	160±20
血清中フィブリン 分解産物濃度 (μg/ml)	0±0	43±14	0±0	8±4

※平均±標準誤差

実施例 4.

静脈血流の鬱滞と静脈壁の傷害で誘発した静脈血栓モデルを用いて、静脈血栓症に対するヒト型化抗ヒトTF抗体の効果を評価した。静脈血流の鬱滞は血管の結紮により作製した。静脈壁の傷害は、「ポリドカノール（食道静脈瘤治療薬、クロイスラー社）」を用い

て惹起した。

推定年齢 3～4 歳、体重 2.97～3.99kg の雄のカニクイザル（広西霊長類実験動物研究センター、中華人民共和国より入手）を用いた。カニクイザルをイソフルラン及び笑気で麻酔し、左右内頸静脈を露出させた。血管露出部の心臓側を完全に結紮した。血管露出部の頭部側は可逆的に結紮した。両結紮部の間の血管に心臓側からカテーテルを挿入した。血管内の血液を除去し、内部を生理食塩水で洗浄した。血管内にカテーテルより 0.5 % ポリドカノールを注入した。カテーテルを除去すると同時に、カテーテル挿入部位の直上流部を可逆的に結紮した。

5 分後、心臓側の可逆的結紮部位を解除し、ポリドカノールを除いた。頭部側の可逆的結紮部位を解除し、少量の血液を流した後、心臓側の可逆的結紮部位を結紮した。血管内に血液が満たされた後、頭部側の可逆的結紮部位を結紮した。血栓作製部位の長さは 1.5 cm になるように調整した。30 分後、形成された血栓湿重量を測定した。評価には左右内頸静脈内の血栓湿重量の合計を用いた。ヒト型化抗ヒト TF 抗体バージョン「i-b 2」は 0.3 mg/kg 及び 1.5 mg/kg の用量で、静脈血栓形成開始の 2 時間前に静脈内投与した。

結果を表 5 に示した。ヒト型化抗ヒト TF 抗体の投与により形成される血栓重量は減少した。従って、ヒト型化抗ヒト TF 抗体が静脈血栓形成の予防効果を有することが明らかになった。

表 5

カニクイザル静脈血栓モデルにおけるヒト型化抗ヒトTF抗体の効果

	被検薬無投与 (n = 2)	ヒト型化 抗ヒトTF抗体 0.3mg/kg i. v. (n = 2)	ヒト型化 抗ヒトTF抗体 1.5mg/kg i. v. (n = 2)
--	-------------------	--	--

静脈血栓湿重量		20.8	1.4	0.0
左右内頸静脈合計		21.9	1.1	0.4
(mg)	平均	21.4	1.3	0.2

実施例 5.

血管狭窄と動脈壁傷害で誘発した動脈血栓モデルを用いて、動脈血栓症に対するヒト型化抗ヒトTF抗体の効果を評価した。血管狭窄及び動脈壁傷害は、先端を丸めた20G 針を挟んで血管を強く結紮し、その針を除去することで作製された。動脈硬化による血管狭窄とプラーク破綻に伴う動脈壁傷害を模したモデルである。

推定年齢 3 ～ 5 歳、体重 3.55 ～ 3.99kg の雄のカニクイザル（広西霊長類実験動物研究センター、中華人民共和国より入手）を用いた。カニクイザルを塩酸ケタミン（筋肉内投与）及びブトファノール（筋肉内投与）で麻酔し、右総頸動脈を露出した。血管にドップラー式血流計プローブを装着し、約 5 分間血流量をモニターした。血流がほぼ一定であることを確認した後、プローブの下流にて血管狭窄及び動脈壁傷害を惹起した。

その後 15 分間血流量を観察し、血栓形成による血管閉塞時間を測定した。右総頸動脈の結紮を除去した後、ヒト型化抗ヒトTF抗体投与を行う場合は投与を行った。左総頸動脈においても、同様に血栓形成による血管閉塞時間を測定した。ヒト型化抗ヒトTF抗体「i -

「i-b 2」は0.3 mg/kg 及び1.5 mg/kg の用量で、左総頸動脈血栓形成開始の1 時間前に静脈内投与した。

結果を表 6 に示した。ヒト型化抗ヒトTF抗体の投与により、血管閉塞時間が減少した。従って、ヒト型化抗ヒトTF抗体が動脈血栓形成の予防効果を有することが明らかとなった。

表 6

カニクイザル動脈血栓症モデルにおけるヒト型化抗ヒトTF抗体の効果

	被検薬 無投与 (n = 2)	ヒト型化 抗ヒトTF 抗体 0.3mg/ kg i.v. (n = 1)	ヒト型化 抗ヒトTF 抗体 1.5mg/ kg i.v. (n = 2)
被検薬投与後の 観察15分間中 血管閉塞時間(分) 〔左総頸動脈〕	12.2	7.2	3.5
被検薬投与前後の 観察15分間中 血管閉塞時間の変化(分) 〔左総頸動脈－右総頸動脈〕	+0.9	-4.4	-6.2

※いずれも群の平均値

実施例 6.

カニクイザル((株) ケアリーより購入、ベトナム産繁殖サル、推定年齢4 - 5 歳) をケタラル 5 ~ 10 mg/kg, imおよびペントバルビタール 15 ~ 20 mg/kg, iv麻酔下に、頸部を切開して頸動脈を露出し、外頸動脈よりフォガティカテーテル(3 ~ 5 F) を挿入してバルーンを膨らませて5 回血管内膜を擦過した。擦過後、カテーテルを抜き去り傷口を縫合し、1 ヶ月後、安楽死させて頸動脈を摘出した。この時バルーン傷害を行わなかった対側の頸動脈についても同様に摘出した。

ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b 2」は0.3 mg/kg

の用量を血管傷害の10分前に1分かけて静脈内投与した。摘出した頸動脈はホルマリン固定した後、組織標本を作製し、HE染色およびエラスチカワンギーソン染色を行い、画像解析により、中膜面積を測定した。その結果、表7に示す様に、ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」は中膜の肥厚を強く抑制した。このことから、ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」は血管組織自体の増生を抑制することで遠隔期に生じる内腔面積の狭小化を防ぎ、有効に再狭窄を予防できることが示唆された。

表 7

	動物番号	非傷害血管	傷害血管
		中膜面積(mm ²)	中膜面積(mm ²)
対照群	1	1.06	2.15 (203%)
	2	0.74	1.45 (196%)
	3	0.82	1.78 (217%)
抗ヒト TF抗体	4	0.75	1.15 (153%)
	5	0.78	0.96 (123%)
	6	0.86	0.98 (114%)

(非傷害側に対する百分率)

実施例 7.

実施例1に記載のモデルにおけるヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」と低分子量ヘパリンの効果を検討した。KPM2/TF226をSCIDマウス(日本クレア、雄、7週齢、体重平均約24g)に移植した6～7週間後に血小板数が腫瘍非移植群の約半分ぐらいになり、凝固亢進状態の持続が確認されたので、移植後49日目に1mg/kgのヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」を静脈内投与または低分子量ヘパリン601.5 IU/kg, 1900.3 IU/kg, 6487

.3 IU/kgを24時間持続放出する浸透圧ポンプを皮下に埋め込むことにより持続投与した。その結果、ヒト型化抗ヒトTF抗体バージョン「i-b2」投与群では、投与の1日後から血小板数の回復が観られ3日後には腫瘍非移植群以上に達し7日後にも効果が残存した。これに対し、低分子量ヘパリンは6487.3 IU/kg投与群で持続投与開始1日後および2日後に血小板数の軽度の回復が観られたが3日後には効果が消失した(図14)。

参考例1. 可溶型ヒトTFの作製法

可溶型ヒトTF (shTF) は以下のように作製した。

ヒトTFの貫通領域(220番目のアミノ酸)以下をFLAGペプチドM2に置換したものをコードする遺伝子を、哺乳動物細胞用の発現ベクター(ネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子を含む)に挿入し、CHO細胞に導入した。ヒトTFのcDNA配列はJames H. Morrisseyらの報告(Cell(1987) 50, 129-135)を参考にした。この可溶型ヒトTFの遺伝子配列とアミノ酸配列を配列番号101及び102に示した。G418により薬剤セレクションし、発現細胞を選抜し、さらにメトトレキサートで発現増幅をかけ、shTF発現細胞を樹立した。

この細胞を無血清培地CHO-S-SFMII(GIBCO)で培養し、shTFを含む培養上清を得た。同容量の40mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で2倍に希釈し、20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.5)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowカラム(1000mL, Pharmacia Biotech)に添加し、0.1M NaClを含む同緩衝液で洗浄後、NaClの濃度を0.3Mとし、shTFをカラムから溶出した。得られたshTF画分に終濃度2.5Mとなるように硫酸アンモニウムを加え、遠心操作(10,000rpm、20分)により夾雑蛋白質を沈殿させた。上清をButyl TOYOPEARL

L (30 mL, T O S O H) に添加し、2.5 M の硫酸アンモニウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄した。

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中、硫酸アンモニウム濃度を 2.5 M から 0 M まで直線的に下げ、shTF を溶出させた。shTF を含むピーク画分を Centri-Prep 10 (アミコン) で濃縮した。150 mM NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した TSK gel G3000 SWG カラム (21.5 × 600 mm, T O S O H) に濃縮液を添加し、shTF のピーク画分を回収した。これを 0.22 μ m のメンブランフィルターで濾過滅菌し、可溶性ヒトTF (shTF) とした。試料の吸光度 280 nm のモル吸光係数を $\epsilon = 40,130$ 、分子量を 43,210 として、試料の濃度を算出した。

参考例 2. 抗TFモノクローナル抗体の作製

1. ヒトTFの精製

ヒト胎盤からのTFの精製は、Itoらの方法 (Ito, T. ら J. Biochem. 114, 691-696, 1993) に準じて行った。すなわち、ヒト胎盤を 10 mM 塩化ベンザミジン、1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニル、1 mM ジイソプロピルフルオロフォスフェートおよび 0.02 % アジ化ナトリウムを含む トリス緩衝生理食塩液 (TBS, pH 7.5) 中でホモジナイズ後、沈殿を冷アセトンで脱脂し、得られた脱脂粉末を 2 % Triton X-100 を含む上記緩衝液に懸濁してTFを可溶化した。

この上清から Concanavalin A-Sepharose 4B カラム (Pharmacia) および抗TF抗体を結合させた Sepharose 4B カラム (Pharmacia) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製TFを得た。これを限外濾過膜 (PM-10, Amicon) で濃縮し、精製標品として 4 °C で保存した。

精製標品中のTF含量は、市販の抗TFモノクローナル抗体 (American Diagnostica) とポリクローナル抗体 (American Diagnostica) を組合せたSandwich ELISAで、組換え型TFを標準にして定量した。

また精製標品の純度は、4-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEしたものを銀染色することで確認した。

2. 免疫とハイブリドーマの作製

精製ヒトTF (約70 μ g/ml) を等容量のFreundの完全アジュバント (Difco) と混合し、乳化した後、5週齢のBalb/c系雄性マウス (日本チャールスリバー) の腹部皮下に、TFとして10 μ g/マウスとなるように免疫した。初回免疫の12, 18及び25日後にはFreundの不完全アジュバントと混合したTFを5 μ g/マウスとなるように皮下に追加免疫し、最終免疫として32日目にPBSで希釈したTF溶液を5 μ g/マウスで腹腔内投与した。

最終免疫の3日後に4匹のマウスから脾細胞を調製し、細胞数で約1/5のマウスミエローマ細胞株P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。融合細胞を10%ウシ胎仔血清を含むRPMI-1640培地 (以下RPMI-培地とする) (Lifetech oriental) に懸濁し、96穴プレートに1匹のマウスにつき400穴播種した。融合後、1, 2, 3, 5日目に培地の半量をHAT (大日本製薬) およびcondimed H1 (Boehringer Mannheim GmbH) を含むRPMI-培地 (以下HAT-培地とする) に交換することで、ハイブリドーマのHAT選択を行った。

下記のスクリーニング法で選択したハイブリドーマは2回の限界希釈を行うことでクローン化した。

限界希釈は、96穴プレート2枚に一穴あたり0.8個の細胞を播種した。検鏡により単一コロニーであることが確認できた穴について、下記に示したTF結合活性とTF中和活性の測定を行いクローンを選択した。得られたクローンはHAT-培地からRPMI-培地に馴化し、馴化による抗体産生能の低下が無いことを確認したうえで、再度限界希釈を行い、完全なクローン化を行った。以上の操作により、TF/ファクターVIIa複合体とファクターXとの結合を強く阻害する抗体6種(ATR-2, 3, 4, 5, 7及び8)を産生するハイブリドーマが樹立できた。

3. 腹水の作製および抗体の精製

樹立したハイブリドーマの腹水の作製は常法に従って行った。すなわち、*in vitro*で継代したハイブリドーマ 10^6 個を、あらかじめ鉱物油を2回腹腔内に投与しておいたBalb/c系雄性マウスの腹腔内に移植した。移植後1～2週目で腹部が肥大したマウスから腹水を回収した。

腹水からの抗体の精製は、Protein Aカラム(日本ガイシ)を装着したConSepLC100システム(Millipore)を用いて行った。

4. Cell-ELISA

TFを高発現することで知られているヒト膀胱癌由来細胞株J82(Fair D.S.ら、J. Biol. Chem., 262, 11692-11698, 1987)をATCCより導入し、RPMI-培地中、37℃、5%CO₂、100%湿度の条件で継代・維持した。

Cell-ELISA用プレートは、96穴プレートにJ82細胞を 10^5 個/穴の濃度で播種し、上記条件で1日培養後、培地を除いてリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド溶液(PFA)を加えて氷冷下で10分静置することで固定化することによって作製した。PFAを除去し、PBSで

洗浄後、1% BSA および 0.02% アジ化ナトリウムを含む Tris 緩衝液 (Blocking 緩衝液) を加えて、使用時まで 4℃ で保存した。

Cell-ELISA は以下のように行った。すなわち、上記のように作製したプレートから Blocking 緩衝液を除去し、抗 TF 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清を加えて室温で 1.5 時間反応させた。0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合したヤギ抗マウス IgG (H+L) (Zymed) を 1 時間反応させ、洗浄後、1 mg/ml の p-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム (Sigma) を添加して 1 時間後に 405/655 nm における吸光度を測定することで、J82 細胞に結合した抗 TF 抗体量を定量した。

5. ファクター Xa 活性を指標とした TF 中和活性測定系

50 μ l の 5 mM CaCl₂ および 0.1% ウシ血清アルブミンを含むトリス緩衝生理食塩液 (TBS: pH 7.6) に 10 μ l のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液 (5 mg/ml) (Thromborel S) (Boehring) と 10 μ l のファクター VIIa 溶液 (82.5 ng/ml) (American Diagnostica) を添加し、室温で 1 時間反応させることで TF/Factor VIIa 複合体を形成させた後、10 μ l の所定濃度に希釈した抗 TF 抗体溶液もしくはハイブリドーマ培養上清および 10 μ l の Factor X 溶液 (3.245 μ g/ml) (Celsus Laboratoire) を添加して 45 分間反応させ、0.5 M EDTA を 10 μ l 添加することで反応を止めた。ここに 2 mM S-2222 溶液 (第一化学薬品) を 50 μ l 添加し、30 分間の 405 nm における吸光度変化をもって TF の Factor Xa 産生活性とした。この方法では、TF/Factor VIIa 複合体と Factor X との結合を阻害する抗体の活性が測定できる。

6. 血漿凝固阻害活性測定系

市販の正常ヒト血漿（コージンバイオ）を用い、この $100 \mu\text{l}$ に適当に希釈した抗TF抗体溶液 $50 \mu\text{l}$ を混和して 37°C で3分間反応させた後、 $50 \mu\text{l}$ のヒト胎盤由来トロンボプラスチン溶液（ 1.25 mg/ml ）を添加し、血漿が凝固するまでの時間を血漿凝固時間測定装置（CR-A: Amelung）で測定した。

7. 抗体のアイソタイプの決定

ハイブリドーマの培養上清もしくは精製抗体について、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（Amersham社製）を用いて抗体のアイソタイプを確認し、結果を表8に示した。

表 8

抗TFモノクローナル抗体のイムノグロブリンアイソタイプ

ATR-2	IgG1, k
ATR-3	IgG1, k
ATR-4	IgG1, k
ATR-5	IgG1, k
ATR-7	IgG2a, k
ATR-8	IgG2a, k

参考例 3. ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

(1) mRNAの調製

参考例2で得たハイブリドーマATR-5（IgG1 κ ）からmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech)を用いて調製した。キット添付の処方に従い、それぞれのハイブリドーマ細胞を抽出緩衝液で完全にホモジナイズし、オリゴ(dT)ーセルローススパンカラムにてmRNAを精製し、エタノール沈殿を行った。mRNA沈殿物を溶出緩衝液に溶解した。

(2) マウス抗体V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製及び増幅

(i) H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法にはMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。

前記のようにして調製したmRNA約1 μ gを鋳型として、キット添付のcDNA synthesis primerを加え、逆転写酵素と42 $^{\circ}$ C、60分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。これをDNAポリメラーゼI、DNAリガーゼ、RNase Hで16 $^{\circ}$ C、1.5時間、T4 DNAポリメラーゼで16 $^{\circ}$ C、45分間反応させることにより、2本鎖cDNAを合成した。2本鎖cDNAをフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。

T4 DNAリガーゼで16 $^{\circ}$ Cで一夜反応することにより、2本鎖cDNAの両端にcDNAアダプターを連結した。反応混合液は10mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1mM

EDTA溶液で50倍に希釈した。これを鋳型としてPCRによりH鎖V領域をコードする遺伝子を増幅させた。5'-側プライマーにはキット添付のアダプタープライマー1を、3'-側プライマーにはMHC-G1プライマー(配列番号1)(S.T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991)を使用した。

ATR-5抗体H鎖V領域に対するPCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM KC

1、6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl_2 、2.5 ユニットの KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、30~50 pmol のアダプタープライマー 1 並びに MHC-G1 プライマー、及び cDNA アダプターを連結した cDNA の反応混合物 1~5 μl を含有する。

PCR はいずれも DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94℃にて30秒間、55℃にて30秒間、74℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

(ii) L鎖V領域 cDNA のクローニング

ヒトTFに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acid Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、操作はキット添付の処方に従って行った。前記のようにして調製した mRNA 約 1 μg を鋳型として cDNA 合成プライマーを加え、逆転写酵素と 42℃、60分間反応させることにより cDNA への逆転写を行った。

これを DNA ポリメラーゼ I、DNA リガーゼ、RNase H で 16℃、1.5時間、T4 DNA ポリメラーゼで 16℃、45分間反応させることにより、2本鎖 cDNA を合成した。2本鎖 cDNA をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収した。T4 DNA リガーゼで 16℃で一夜反応することにより、2本鎖 cDNA の両端に cDNA アダプターを連結した。反応混合液は 10 mM Tricine-KOH (pH 8.5)、0.1 mM

E D T A 溶液で 50 倍に希釈した。これを鋳型として P C R により L 鎖 V 領域をコードする遺伝子を増幅させた。5' - 側プライマーにはアダプタープライマー 1 を、3' - 側プライマーには M K C プライマー (配列番号 2) (S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

P C R 溶液は、100 μ l 中に 120 mM T r i s - H C l (p H 8. 0)、10 mM K C l、6 mM (N H₄)₂ S O₄、0. 1% T r i t o n X-100、0. 001% B S A、0. 2 mM d N T P s (d A T P, d G T P, d C T P, d T T P)、1 mM M g C l₂、2. 5 ユニットの K O D DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、30 ~ 50 p m o l e のアダプタープライマー 1 並びに M K C プライマー、及び c D N A アダプターを連結した c D N A の反応混合物 1 μ l を含有する。

P C R は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、74 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

(3) P C R 生成物の精製及び断片化

前記の P C R 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した D N A 断片をエタノール沈殿により回収した。D N A 断片を制限酵素 X m a I (New England Biolabs) により 37 $^{\circ}$ C で 1 時間消化した。X m a I 消化混合物を 2% から 3% の NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、H 鎖 V 領域として約 500 b p 長、L 鎖 V 領域として約 500 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、10 mM T r i s - H C l (p H 8. 0)、1 mM E D T A 溶液 (以下、T E と称す) 10 μ l に

溶解した。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域及びL鎖V領域をコードする遺伝子を含むXma I消化DNA断片と、Xma Iで消化することにより調製したpUC19プラスミドベクターとをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。

次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)(以下、LBA寒天培地と称す)上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を50μg/mlアンピシリンを含有するLB培地(以下、LBA培地と称す)3mlあるいは4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

(4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A(Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)(配列番号3)及びM13 Primer RV(宝酒造)(配列番号4)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマATR-5に由来するマウスH

鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをA T R - 5 H v / p U C 1 9 と命名し、そしてL鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをA T R - 5 L v / p U C 1 9 と命名した。プラスミドA T R - 5 H v / p U C 1 9 に含まれる各マウス抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列（対応するアミノ酸配列を含む）をそれぞれ配列番号5及び99に、プラスミドA T R - 5 L v / p U C 1 9 に含まれる各マウス抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列（対応するアミノ酸配列を含む）をそれぞれ配列番号6及び100に示す。

参考例 4. キメラ抗体の構築

マウスA T R - 5 抗体V領域をヒト抗体C領域に連結したキメラA T R - 5 抗体を作製した。A T R - 5 抗体V領域をコードする遺伝子をヒト抗体C領域をコードする発現ベクターに連結することにより、キメラ抗体発現ベクターを構築した。

(1) キメラ抗体H鎖V領域の構築

ヒト抗体H鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、A T R - 5 抗体H鎖V領域をP C R 法により修飾した。5' - 側プライマーc h 5 H S（配列番号7）はV領域をコードするD N A の5' - 末端にハイブリダイズし、且つK o z a k コンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素S a l I の認識配列を有するように設計した。3' - 側プライマーc h 5 H A（配列番号8）はJ領域をコードするD N A の3' - 末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素N h e I の認識配列を有するように設計した。

P C R 溶液は、100 μ l 中に120 mM T r i s - H C l（p H 8.0）、10 mM K C l、6 mM (N H₄)₂ S O₄、0.1% T r i t o n X - 100、0.001% B S A、0

2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 mM MgCl₂、2.5 ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡績)、50 pmoleのch5HSプライマー並びにch5HAプライマー、及び鑄型DNAとして1 μ lのプラスミドATR5Hv/pUC19を含有する。PCRはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer)を用い、94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間、74 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。

PCR反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅したDNA断片をエタノール沈殿により回収した。DNA断片を制限酵素NheI(宝酒造)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化し、次いで制限酵素SalI(宝酒造)により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。この消化混合物を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20 μ lに溶解した。

クローニングベクターには制限酵素NheI、SalI及びSspI、BglIIの認識配列を導入した改変pUC19ベクター(以下、CVIDECと称す)を用いた。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子断片とNheI及びSalIで消化することにより調製したCVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2(宝酒造)を用い、添付の処方に従い16 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)100 μ lに加え、氷上で30分間、42 $^{\circ}$ Cにて1分間静置した。次いで300 μ lのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした後、LBA寒天培地

上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地3mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体H鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にSalI認識配列及びKozakコンセンサス配列、3'-側にNheI認識配列を持つプラスミドをchATR5Hv/CVIDECと命名した。

(2) キメラ抗体L鎖V領域の構築

ヒト抗体L鎖C領域をコードする発現ベクターに連結するために、ATR-5抗体L鎖V領域をPCR法により修飾した。5'-側プライマーch5LS(配列番号9)はV領域をコードするDNAの5'-末端にハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)及び制限酵素BglIIの認識配列を有するように設計した。3'-側プライマーch5LA(配列番号10)はJ領域をコードするDNAの3'-末端にハイブリダイズし、且つ制限酵素SplIの認識配列を有するように設計した。

PCR溶液は、100μl中に120mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP

)、1 mM $MgCl_2$ 、2.5 ユニットの KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡績)、50 pmole の ch5LS プライマー並びに ch5LA プライマー、及び鋳型 DNA として 1 μ l のプラスミド ATR5Lv/pUC19 を含有する。PCR は DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を用い、94 °C にて 30 秒間、55 °C にて 30 秒間、74 °C にて 1 分間の温度サイクルで 30 回行った。

PCR 反応混合液をフェノール及びクロロホルムで抽出し、増幅した DNA 断片をエタノール沈殿により回収した。DNA 断片を制限酵素 SspI (宝酒造) により 37 °C で 1 時間消化し、次いで制限酵素 BglII (宝酒造) により 37 °C で 1 時間消化した。この消化混合物を 3 % NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 400 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、20 μ l の TE に溶解した。

上記のようにして調製したマウス L 鎖 V 領域をコードする遺伝子断片と SspI 及び BglII で消化することにより調製した CVI D E C ベクターを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16 °C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間、42 °C にて 1 分間静置した。次いで 300 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37 °C にて 1 時間インキュベートした後、100 μ g/ml LBA 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37 °C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を LBA 培地 3 ml で 37 °C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造)及びM13 Primer RV(宝酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。このATR-5抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含み、5'-側にBglII認識配列及びKozakコンセンサス配列、3'-側にSplI認識配列を持つプラスミドをchATR5Lv/CVIDECと命名した。

(3) キメラ抗体発現ベクターの構築

IDEC社より導入した抗体発現ベクターを用いてキメラ抗体発現ベクターを構築した。ベクターにはIgG1型抗体発現ベクターN5KG1(V)及びIgG4型抗体発現ベクターN5KG4Pを用いた。発現ベクターN5KG1(V)あるいはN5KG4Pのヒト抗体H鎖C領域の直前にあるSalI-NheI部位にATR-5のH鎖V領域をコードする遺伝子を、ヒト抗体L鎖C領域の直前にあるBglII-SplI部位にATR-5のL鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、キメラATR-5抗体発現ベクターを作製した。

(i) H鎖V領域の導入

プラスミドchATR5Hv/CVIDECを制限酵素NheI(宝酒造)により37℃で3時間消化し、次いで制限酵素SalI(宝酒造)により37℃で3時間消化した。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約450bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、T

E 2 0 μ l に溶解した。

発現ベクター N 5 K G 1 (V) 及び N 5 K G 4 P を制限酵素 N h e I (宝酒造) により 3 7 °C で 3 時間消化し、次いで制限酵素 S a l I (宝酒造) により 3 7 °C で 3 時間消化した。この消化混合物を 1 . 5 % NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 9 0 0 0 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、D N A 断片をエタノールで沈殿させた後、T E 6 0 μ l に溶解した。

上記のようにして調製した H 鎖 V 領域をコードする遺伝子を含む S a l I - N h e I D N A 断片と S a l I 及び N h e I で消化した N 5 K G 1 (V) あるいは N 5 K G 4 P を D N A ライゲーションキット v e r . 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 1 6 °C で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 1 0 0 μ l に加え、氷上で 3 0 分間、4 2 °C にて 1 分間静置した。次いで 3 0 0 μ l の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 3 7 °C にて 1 時間インキュベートした後、1 0 0 μ g / m l L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、3 7 °C にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 m l で 3 7 °C にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド D N A を調製した。これらキメラ A T R - 5 抗体 H 鎖をコードする遺伝子を含有するプラスミドをそれぞれ c h A T R 5 H v / N 5 K G 1 (V)、及び c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P と命名した。

(i i) L 鎖 V 領域の導入

プラスミド c h A T R 5 L v / C V I D E C を制限酵素 B g 1 I I

(宝酒造) 及び S p l I (宝酒造) により 37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、20μlのTEに溶解した。

プラスミド c h A T R 5 H v / N 5 K G 1 (V) 及び c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P を制限酵素 B g l II (宝酒造) 及び S p l I (宝酒造) により 37℃で1.5時間消化した。この消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約9400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TE 20μlに溶解した。

上記のようにして調製したL鎖V領域をコードする遺伝子を含む S p l I - B g l II DNA断片と S p l I 及び B g l II で消化した c h A T R 5 H v / N 5 K G 1 (V) あるいは c h A T R 5 H v / N 5 K G 4 P をDNAライゲーションキット v e r . 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、100μg/ml LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を50μg/ml アンピシリンを含有する2×YT培地11で37℃にて一

夜培養し、菌体画分から P l a s m i d M a x i K i t (Q I A G E N) を用いてプラスミド DNA を調製した。これらキメラ A T R - 5 抗体をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ c h A T R 5 / N 5 K G 1 (V)、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P と命名した。

(4) C O S - 7 細胞へのトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを C O S - 7 細胞にトランスフェクションし、キメラ抗体を一過性に発現させた。

プラスミド c h A T R 5 / N 5 K G 1 (V) あるいは c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を G e n e P u l s e r 装置 (B i o R a d) を用いてエレクトロポレーションにより C O S - 7 細胞に形質導入した。ダルベッコ P B S (-) (以下、P B S と称す) 中に 1×10^7 細胞 / m l の細胞濃度で懸濁されている C O S - 7 細胞 0.78 m l に、プラスミド 50 μ g を加え、1,500 V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を 5% の U l t r a L o w I g G ウシ胎児血清 (G I B C O) を含む D M E M 培地 (G I B C O) に懸濁し、10 c m 培養皿を用いて C O₂ インキュベーターにて培養した。24 時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地 H B C H O (アーバインサイエンティフィック) を加えた。さらに 72 時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5) 抗体の精製

C O S - 7 細胞の培養上清からキメラ抗体を、rProtein A Sepha rose Fast Flow (Pharmacia Biotech) を用いて以下のように精製した。

1 ml の rProtein A Sepharose Fast Flow をカラムに充填し、10 倍量の TBS を流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムに COS-7 細胞の培養上清をアプライした後、10 倍量の TBS によってカラムを洗浄した。

次に、13.5 ml の 2.5 mM HCl (pH 3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出し、直ちに 1.5 ml の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ 100 (Amicon) を用いた限外濾過を 2 回行うことにより、150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) (以下、TBS と称す) に溶媒を置換し、最終的に約 1.5 ml まで濃縮した。

(6) CHO 安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、CHO-S-SF MII 無血清培地 (GIBCO) に馴化した CHO 細胞 (DG44) に前記発現プラスミドを導入した。

プラスミド chATR5/N5KG1 (V) あるいは chATR5/N5KG4P を制限酵素 SspI (宝酒造) で切断して直鎖状 DNA にし、フェノール及びクロロホルムで抽出の後、エタノール沈殿で DNA を回収した。直鎖状にしたプラスミドを Gene Pulser 装置 (Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションにより DG44 細胞に形質導入した。PBS 中に 1×10^7 細胞/ml の細胞濃度で懸濁されている DG44 細胞 0.78 ml に、プラスミド 10 μ g を加え、1,500 V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理

された細胞をヒポキサンチン・チミジン (G418 BCO) を含有する CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO) に懸濁し、2 枚の 96 穴プレート (Falcon) を用いて CO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、ヒポキサンチン・チミジン (GIBCO) 及び 500 μ g/ml GENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) を含有する CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO) の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2 週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、後述の抗体濃度測定 ELISA にて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

参考例 5. ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体 H 鎖の構築

(i) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” の構築

ヒト型化 ATR-5 抗体 H 鎖を、PCR 法による CDR-グラフトイングにより作製した。ヒト抗体 L39130 (DDBJ, Gao L. ら、未発表、1995) 由来の FR を有するヒト型化 ATR-5 抗体 H 鎖バージョン “a” の作製のために 7 個の PCR プライマーを使用した。CDR-グラフトイングプライマー hR5Hv1S (配列番号 11)、hR5Hv2S (配列番号 12) 及び hR5Hv4S (配列番号 13) はセンス DNA 配列を有し、そして CDR グラフトイングプライマー hR5Hv3A (配列番号 14) 及び hR5Hv5A (配列番号 15) はアンチセンス DNA 配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に 18-35 bp の相補的配列を有する。

hR5Hv1S は Kozak コンセンサス配列 (Kozak, M. ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) 及び SalI 認識部位を有するように、また hR5Hv5A は NheI 認識部位を有するように設計した。また外部プライマー hR

5 H v P r S (配列番号 16) は C D R グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S と、h R 5 H v P r A (配列番号 17) は C D R グラフティングプライマー h R 5 H v 5 A とホモロジーを有する。

C D R - グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S、h R 5 H v 2 S、h R 5 H v 3 A、h R 5 H v 4 S 及び h R 5 H v 5 A、ならびに外部プライマー h R 5 H v P r S 及び h R 5 H v P r A は P h a r m a c i a B i o t e c h により合成及び精製された。

P C R は、K O D D N A ポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、98 μ l 中に 120 mM T r i s - H C l (p H 8.0)、10 mM K C l、6 mM (N H₄)₂ S O₄、0.1% T r i t o n X - 100、0.001% B S A、0.2 mM d N T P s (d A T P、d G T P、d C T P、d T T P)、1 mM M g C l₂、2.5 ユニットの K O D D N A ポリメラーゼ (東洋紡績)、C D R - グラフティングプライマー h R 5 H v 1 S、h R 5 H v 2 S、h R 5 H v 3 A、h R 5 H v 4 S 及び h R 5 H v 5 A をそれぞれ 5 p m o l e を含む条件で添付緩衝液を使用して 94 °C にて 30 秒間、50 °C にて 1 分間、72 °C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 100 p m o l e の外部プライマー h R 5 H v P r S 及び h R 5 H v P r A を加え、100 μ l の系で同じ温度サイクルを 25 回行った。P C R 法により増幅した D N A 断片を 2% の N u S i e v e G T G アガロース (F M C B i o . P r o d u c t s) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

約 430 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した。精製した D N A をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 17 μ l に溶解した。得られた P C R 反応混合物を N h e I 及

びS a l Iで消化し、N h e I及びS a l Iで消化することにより調製したプラスミドベクターC V I D E Cに、DNAライゲーションキットv e r. 2（宝酒造）を用い添付の処方に従って反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞（ニッポンジーン）1 0 0 μ lに加え、氷上で3 0 分間、4 2 $^{\circ}$ Cにて1 分間静置した。次いで3 0 0 μ lのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え3 7 $^{\circ}$ Cにて1 時間インキュベートした後、L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、3 7 $^{\circ}$ Cにて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A 培地3 m lで3 7 $^{\circ}$ Cにて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のc DNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い、DNA Sequencer 373A（Perkin-Elmer）により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）及びM13 Primer RV（宝酒造）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

E c o T 2 2 I 認識部位の前もしくは後に変異、欠失が認められたため、それぞれ正しい配列を有する断片を連結して再度C V I D E Cにサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをh A T R 5 H v a / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“a”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号1 8 に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号1 9 に示す。

（i i）ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“c”の構築

バージョン “a” 及び “c” を F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “b” では F R 3 をヒト抗体 Z34963 (DDBJ、Borretzen M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 12917-12921, 1994) 由来のものに置換するため、F R 3 をコードする D N A プライマーを 4 個作製した。F R - シャッフリングプライマー F 3 R F F S (配列番号 2 0) 及び F 3 R F B S (配列番号 2 1) はセンス D N A 配列を有し、F 3 R F F A (配列番号 2 2) 及び F 3 R F B A (配列番号 2 3) はアンチセンス D N A 配列を有する。

F 3 R F F S と F 3 R F F A は互いに相補的な配列を有し、両端に B a l I 及び X h o I の認識配列を有する。F 3 R F B S と F 3 R F B A は互いに相補的な配列を有し、両端に X h o I 及び N c o I の認識配列を有する。バージョン “c” では F R 3 をヒト抗体 P 0 1 8 2 5 (SWISS-PROT、Poljak R.J. ら, Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977) 由来のものに置換するため、F R 3 をコードする D N A プライマーを 4 個作製した。F R - シャッフリングベクター F 3 N M F S (配列番号 2 4) 及び F 3 N M B S (配列番号 2 5) はセンス D N A 配列を有し、F 3 N M F A (配列番号 2 6) 及び F 3 N M B A (配列番号 2 7) はアンチセンス D N A 配列を有する。

F 3 N M F S と F 3 N M F A は互いに相補的な配列を有し、両端に B a l I 及び X h o I の認識配列を有する。F 3 N M B S と F 3 N M B A は互いに相補的な配列を有し、両端に X h o I 及び N c o I の認識配列を有する。

F 3 R F F S、F 3 R F B S、F 3 R F F A、F 3 R F B A、F 3 N M F S、F 3 N M B S、F 3 N M F A 及び F 3 N M B A は P h a r m a c i a B i o t e c h により合成された。F 3 R F F S と F 3 R F F A、F 3 R F B S と F 3 R F B A をアニールさせ、そ

れぞれ B a l I 及び X h o I、N c o I 及び X h o I で消化した。これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v b / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “b” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 28 に示す。また、バージョン “b” のアミノ酸配列を配列番号 29 に示す。

F 3 N M F S と F 3 N M F A、F 3 N M B S と F 3 N M B A をアニールさせ、それぞれ B a l I 及び X h o I、N c o I 及び X h o I で消化した。これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v c / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v c / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “c” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 30 に示す。また、バージョン “c” のアミノ酸配列を配列番号 31 に示す。

(i i i) ヒト型化 H 鎖バージョン “d” 及び “e” の構築

バージョン “d” 及び “e” を F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “d” では F R 3 をヒト抗体 M62723 (DDBJ、Pascual V. ら, J. Clin. Invest., 86, 1320-1328, 1990) 由来のものに置換するため、F R 3 をコードする D N A プライマーを 4 個作製した。F R - シャッフリングプライマー F 3 E P S (配列番号 32) はセンス D N A 配列を有し、F 3 E P A (配列番号 33) はアンチセンス D N A 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 18 b p の相

補的配列を有する。

また外部プライマー F 3 P r S (配列番号 3 4) 及び F 3 P r A (配列番号 3 5) は F R - シャッフリングプライマー F 3 E P S 及び F 3 E P A とホモロジーを有し、他の F R 3 のシャッフリングにも用いることができる。バージョン “e” では F R 3 をヒト抗体 Z 8 0 8 4 4 (DDBJ、Thomsett AR. ら, unpublished) 由来のものに置換するため、F R 3 をコードする D N A プライマーを 2 個作製した。F R - シャッフリングプライマー F 3 V H S (配列番号 3 6) はセンス D N A 配列を有し、F 3 V H A (配列番号 3 7) はアンチセンス D N A 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 1 8 b p の相補的配列を有する。F 3 E P S、F 3 E P A、F 3 P r S、F 3 P r A、F 3 V H S 及び F 3 V H A は Pharmacia Biotech により合成された。

P C R は、KOD DNA Polymerase (東洋紡績) を用い、1 0 0 μ l の反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリングプライマー F 3 E P S と F 3 E P A、又は F 3 V H S と F 3 V H A をそれぞれ 5 μ l、0. 2 mM の d N T P s、1. 0 mM の M g C l₂、2. 5 U の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 9 4 °C にて 3 0 秒間、5 0 °C にて 1 分間、7 4 °C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 1 0 0 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 2 5 回行った。

P C R 法により増幅した D N A 断片を 2 % の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。4 2 4 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した。精製した D N A をエタノールで沈殿させた後、その 3 分

の1量を水14μlに溶解した。得られたPCR反応混合物をB a l I及びN c o Iで消化し、これらをB a l I及びN c o Iで消化することにより調製したプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドをh A T R 5 H v d / C V I D E C及びh A T R 5 H v e / C V I D E Cと命名した。プラスミドh A T R 5 H v d / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号38に、バージョン“d”のアミノ酸配列を配列番号39に示す。また、プラスミドh A T R 5 H v e / C V I D E Cに含まれるヒト型化H鎖バージョン“e”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号40に、バージョン“e”のアミノ酸配列を配列番号41に示す。

(i v) ヒト型化H鎖バージョン“f”及び“g”の構築

バージョン“f”及び“g”はFR-シャッフリング法によってバージョン“a”のFR3を別のヒト抗体由来のFR3に置換し作製した。バージョン“f”はヒト抗体L04345 (DDBJ、Hillson JL. ら, J. Exp. Med., 178, 331-336, 1993) 由来のFR3に、バージョン“g”はS78322 (DDBJ、Bejcek BE. ら, Cancer Res., 55, 2346-2351, 1995) 由来のFR3に置換するためFR3をコードするプライマーを2個ずつ合成した。バージョン“f”のFR-シャッフリングプライマーF3SSS (配列番号42) はセンスDNA配列を有し、F3SSA (配列番号43) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。

バージョン“g”のFR-シャッフリングプライマーF3CDS (配列番号44) はセンスDNA配列を有し、F3CDA (配列番号45) はアンチセンスDNA配列を有し、プライマーの3'-末端は18bpの相補的配列を有する。F3SSS、F3SSA、F

3 C D S 及び F 3 C D A は Pharmacia Biotech により合成及び精製された。P C R は、K O D DNA ポリメラーゼ（東洋紡績）を用い、1 0 0 μ l の反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリングプライマー F 3 S S S 及び F 3 S S A もしくは F 3 C D S 及び F 3 C D A をそれぞれ 5 μ l ずつ、0. 2 m M の d N T P s、1. 0 m M の M g C l 2、2. 5 U の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 9 4 $^{\circ}$ C にて 3 0 秒間、5 0 $^{\circ}$ C にて 1 分間、7 4 $^{\circ}$ C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 1 0 0 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 2 5 回行った。

P C R 法により増幅した D N A 断片を 2 % の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。4 2 4 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した。精製した D N A をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 1 4 μ l に溶解した。得られた P C R 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v f / C V I D E C 及び h A T R 5 H v g / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v f / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “ f ” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “ f ” アミノ酸配列を配列番号 4 6 及び 4 7 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v g / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “ g ” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン

ン “g” のアミノ酸配列を配列番号 48 及び 49 に示す。

(v) ヒト型化 H 鎖バージョン “h” の構築

バージョン “h” は F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “h” はヒト抗体 Z26827 (DDBJ、Van Der Stoep ら, J. Exp. Med., 177, 99-107, 1993) 由来の F R 3 に置換するため F R 3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン “h” の F R - シャッフリングプライマー F 3 A D S (配列番号 50) はセンス DNA 配列を有し、F 3 A D A (配列番号 51) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 18 bp の相補的配列を有する。

F 3 A D S 及び F 3 A D A は Pharmacia Biotech により合成及び精製された。P C R は、K O D DNA ポリメラーゼ (東洋紡績) を用い、100 μ l の反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリングプライマー F 3 A D S 及び F 3 A D A をそれぞれ 5 μ l ずつ、0.2 mM の d N T P s、1.0 mM の M g C l₂、2.5 U の K O D DNA ポリメラーゼを含む条件で添付緩衝液を使用して 94 °C にて 30 秒間、50 °C にて 1 分間、74 °C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 100 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 25 回行った。P C R 法により増幅した DNA 断片を 2 % の Nu Sieve GTG アガロース (F M C B i o . P r o d u c t s) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

424 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切取り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により DNA 断片を精製した。精製した DNA をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を

水 14 μ l に溶解した。得られた PCR 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v h / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v h / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “h” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 52 に示す。また、バージョン “h” のアミノ酸配列を配列番号 53 に示す。

(v i) ヒト型化 H 鎖バージョン “i” 及び “j” の構築

バージョン “i” 及び “j” は F R - シャッフリング法によってバージョン “a” の F R 3 を別のヒト抗体由来の F R 3 に置換し作製した。バージョン “i” はヒト抗体 U 9 5 2 3 9 (DDBJ、Manheimer-Lory AJ., unpublished) 由来の F R 3 に、バージョン “j” は L 0 3 1 4 7 (DDBJ、Collet TA. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 10026-10030, 1992) 由来の F R 3 に置換するため F R 3 をコードするプライマーを 2 個ずつ合成した。バージョン “i” の F R - シャッフリングプライマー F 3 M M S (配列番号 54) はセンス DNA 配列を有し、F 3 M M A (配列番号 55) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 18 b p の相補的配列を有する。

バージョン “j” の F R - シャッフリングプライマー F 3 B M S (配列番号 56) はセンス DNA 配列を有し、F 3 B M A (配列番号 57) はアンチセンス DNA 配列を有し、プライマーの 3' - 末端は 18 b p の相補的配列を有する。F 3 M M S、F 3 M M A、F 3 B M S 及び F 3 B M A は Pharmacia Biotech により合成及び精製された。PCR は、Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer) を用い、10

0 μ l の反応混合液に 1 μ M の F R - シャッフリングプライマー F 3 M M S と F 3 M M A、又は F 3 B M S と F 3 B M A をそれぞれ 5 μ l ずつ、0.2 mM の d N T P s、1.5 mM の M g C l₂、2.5 U の Ampli Taq Gold を含む条件で添付緩衝液を使用して 94 °C にて 30 秒間、50 °C にて 1 分間、74 °C にて 1 分間の温度サイクルで 5 回行い、さらに 100 p m o l e の外部プライマー F 3 P r S 及び F 3 P r A を加え、同じ温度サイクルを 25 回行った。

P C R 法により増幅した D N A 断片を 2 % の Nu Sieve GTG アガロース (FMC Bio.Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。424 b p 長の D N A 断片を含有するアガロース片を切り、3 倍量 (m l / g) の T E を添加し、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出により D N A 断片を精製した。精製した D N A をエタノールで沈殿させた後、その 3 分の 1 量を水 14 μ l に溶解した。得られた P C R 反応混合物を B a l I 及び N c o I で消化し、これらを B a l I 及び N c o I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v a / C V I D E C (B a l I / N c o I) に導入し、塩基配列を決定した。

正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v i / C V I D E C 及び h A T R 5 H v j / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “i” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “i” アミノ酸配列を配列番号 58 及び 59 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v j / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “j” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “j” のアミノ酸配列を配列番号 60 及び 61 に示す。

(v i i) ヒト型化 H 鎖バージョン “b 1” 及び “d 1” の構築バージョン “b 1” 及び “d 1” は F R - シャッフリング法によ

ってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のFR2に置換し作製した。ヒト抗体P01742 (SWISS-PROT、Cunningham BA.ら、Biochemistry, 9, 3161-3170, 1970) 由来のものに置換するため、FR2をコードするDNAプライマーを2個作製した。FR-シャッフリングベクターF2MPS (配列番号62) はセンスDNA配列を有し、F2MPA (配列番号63) はアンチセンスDNA配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端にはEcoT22I及びBamIの認識配列を有する。

F2MPS、F2MPAはPharmacia Biotechにより合成及び精製された。F2MPSとF2MPAをアニールさせ、EcoT22I及びBamIで消化した。これをEcoT22I及びBamIで消化することにより調製したプラスミドhATR5Hvb/CVIDEC (EcoT22I/BamI) 及びhATR5Hvd/CVIDEC (EcoT22I/BamI) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhATR5Hvb1/CVIDEC及びhATR5Hvd1/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Hvb1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号64及び65に示す。また、プラスミドhATR5Hvd1/CVIDECに含まれるヒト型化H鎖バージョン“d1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“d1”のアミノ酸配列を配列番号66及び67に示す。

(v i i i) ヒト型化H鎖バージョン“b3”及び“d3”の構築

バージョン“b3”及び“d3”はFR-シャッフリング法によってバージョン“b”及び“d”のFR2を別のヒト抗体由来のF

R 2 に置換し作製した。ヒト抗体 Z80844 (DDBJ、Thomsett AR. ら, unpublished) 由来の F R 2 に置換するため、F R 2 をコードする D N A プライマーを 2 個作製した。F R - シャッフリングベクター F 2 V H S (配列番号 6 8) はセンス D N A 配列を有し、F 2 V H A (配列番号 6 9) はアンチセンス D N A 配列を有する。また、互いに相補的な配列を有し、両端には E c o T 2 2 I 及び B a l I の認識配列を有する。F 2 V H S、F 2 V H A は Pharmacia Biotech に合成、精製を委託した。

F 2 V H S と F 2 V H A をアニールさせ、E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化した。これを E c o T 2 2 I 及び B a l I で消化することにより調製したプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a l I) 及び h A T R 5 H v d / C V I D E C (E c o T 2 2 I / B a l I) に導入し、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドを h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C と命名した。プラスミド h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “b 3” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “b 3” アミノ酸配列を配列番号 7 0 及び 7 1 に示す。また、プラスミド h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C に含まれるヒト型化 H 鎖バージョン “d 3” の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン “d 3” のアミノ酸配列を配列番号 7 2 及び 7 3 に示す。

(2) ヒト型化抗体 L 鎖 V 領域の構築

(i) バージョン “a”

ヒト型化 A T R 5 抗体 L 鎖を、P C R 法による C D R - グラフティングにより作製した。ヒト抗体 Z37332 (DDBJ、Welschhof M ら, J. Immunol. Methods, 179, 203-214, 1995) 由来のフレームワーク領域

を有するヒト型化抗体L鎖（バージョン”a”）の作製のために7本のPCRプライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S（配列番号74）及びh5Lv4S（配列番号75）はセンスDNA配列を、CDRグラフティングプライマーh5Lv2A（配列番号76）、h5Lv3A（配列番号77）及びh5Lv5A（配列番号78）はアンチセンスDNA配列を有し、各プライマーの両端に20bpの相補的配列を有する。外部プライマーh5LvS（配列番号79）及びh5LvA（配列番号80）はCDRグラフティングプライマーh5Lv1S及びh5Lv5Aとホモロジーを有する。CDR-グラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv4S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv5A、h5LvS及びh5LvAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。

PCR溶液は、100 μ l中に120mM Tris-HCl（pH8.0）、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）、1mM MgCl_2 、2.5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ（東洋紡績）、5pmoleのCDRグラフティングプライマーh5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv4S、及びh5Lv5Aを含有する。

PCRはDNA Thermal Cycler 480（Perkin-Elmer）を用い、94 $^{\circ}\text{C}$ にて30秒間、50 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間、72 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間の温度サイクルを5回行うことにより、5本のCDRグラフティングプライマーをアセンブルした。この反応混合液に100pmoleの外部プライマーh5LvS及びh5LvAを加え、94 $^{\circ}\text{C}$ にて30秒間、52 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間、72 $^{\circ}\text{C}$ にて1分間の温度サイクルを30回

行うことにより、アセンブルしたDNA断片を増幅した。

PCR反応混合液を3% NuSieve GTGアガロース(FMC BioProducts)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノール沈殿により回収した。回収したDNA断片を制限酵素S p l I (宝酒造) 及びB g l II (宝酒造) により37℃で4時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、T E 1 0 μ l に溶解した。上記のようにして調製したヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むS p l I - B g l II DNA断片とS p l I 及びB g l IIで消化することにより調製したC V I D E C ベクターをDNAライゲーションキットv e r. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌J M 1 0 9 コンピテント細胞(ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ l のHi-Competence Broth(ニッポンジーン) を加え37℃にて1時間インキュベートした後、L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をL B A 培地3 m l で37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM 1 3 P r i m e r M 4 (宝酒造) 及びM 1 3 P r i m e r R V (宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を

確認することにより配列を決定した。このヒト型化抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むし、5'側にはBglII認識配列及びKozak配列、3'側にはSplI認識配列を持つプラスミドをhATR5Lv a / CVIDECと命名した。ヒト型化L鎖バージョン“a”の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）を配列番号81に示す。また、バージョン“a”のアミノ酸配列を配列番号82に示す。

(i i) バージョン“b”及び“c”

バージョン“b”及び“c”を、バージョン“a”のFR3を置換（FR-シャッフリング）することにより作製した。バージョン“b”にはヒト抗体S68699（DDBJ、Hougs L ら, Exp.Clin.Immunogen et., 10, 141-151, 1993）由来のFR3を、バージョン“c”にはヒト抗体P01607（SWISS-PROT、Epp O ら, Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975）由来のFR3をそれぞれ使用した。

バージョン“b”のFR3をコードするプライマーF3SS（配列番号83）とF3SA（配列番号84）、あるいはバージョン“c”のFR3をコードするプライマーF3RS（配列番号85）とF3RA（配列番号86）は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素KpnI及びPstIの認識配列を有する。F3SS、F3SA、F3RS、F3RAはPharmacia Biotechに合成、精製を委託した。各100 pmoleのF3SSとF3SA、あるいはF3RSとF3RAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理することによりアニーリングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素KpnI（宝酒造）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素PstI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解し

た。

プラスミド h A T R 5 L v a / C V I D E C を制限酵素 K p n I (宝酒造) により 37℃ で 1 時間消化し、次いで制限酵素 P s t I (宝酒造) により 37℃ で 1 時間消化した。消化混合物を 1.5% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約 3000 bp 長の DNA 断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA 断片をエタノールで沈殿させた後、TE に溶解した。

上記のようにして調製したバージョン “b” あるいは “c” の FR3 をコードする K p n I - P s t I DNA 断片と K p n I 及び P s t I で消化することにより FR3 を除去した h A T R 5 L v a / C V I D E C ベクターを DNA ライゲーションキット ver. 2 (宝酒造) を用い、添付の処方に従い 16℃ で 1 時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 µl に加え、氷上で 30 分間、42℃ にて 1 分間静置した。次いで 300 µl の Hi-Competence Broth (ニッポンジーン) を加え 37℃ にて 1 時間インキュベートした後、L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃ にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体を L B A 培地 3 ml で 37℃ にて一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミド DNA を調製した。

プラスミド中の c DNA コード領域の塩基配列を Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとして M13 Primer M4 (宝酒造) 及び M13 Primer RV (宝

酒造)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“a”のFR3を置換したバージョン“b”あるいはバージョン“c”をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれhATR5Lv_b/CVIDEC、hATR5Lv_c/CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv_b/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列ならびにバージョン“b”アミノ酸配列を配列番号87および88に示す。また、プラスミドhATR5Lv_c/CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“c”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列およびバージョン“c”のアミノ酸配列を配列番号89および90に示す。

(iii) バージョン“b1”及び“b2”

バージョン“b1”及び“b2”を、バージョン“b”のFR2を置換することにより作製した。バージョン“b1”にはヒト抗体S65921 (DDBJ、Tonge DWら, Year Immunol., 7, 56-62, 1993)由来のFR2を、バージョン“b2”にはヒト抗体X93625 (DDBJ、Cox JPら, Eur. J. Immunol., 24, 827-836, 1994)由来のFR2をそれぞれ使用した。

バージョン“b1”のFR2をコードするプライマーF2SS (配列番号91)とF2SA (配列番号92)、あるいはバージョン“b2”のFR2をコードするプライマーF2XS (配列番号93)とF2XA (配列番号94)は互いに相補的な配列を有し、両端に制限酵素AflII及びSpeIの認識配列を有する。F2SS、F2SA、F2XS及びF2XAはPharmacia Biotechにより合成された。各100 pmoleのF2SSとF2SA、あるいはF2XSとF2XAを96℃にて2分間、50℃にて2分間処理するこ

とによりアニーシングさせ、2本鎖DNA断片を作製した。

これら2本鎖DNA断片を制限酵素AflII（宝酒造）及びSpeI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

プラスミドhATR5Lv/CVIDECを制限酵素AflII（宝酒造）及びSpeI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。消化混合物を1.5% NuSieve GTGアガロース（FMC BioProducts）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約3000bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

上記のようにして調製したバージョン“b1”あるいは“b2”のFR2をコードするAflII-SpeI DNA断片とAflII及びSpeIで消化することによりFR2を除去したhATR5Lv/CVIDECベクターをDNAライゲーションキットver. 2（宝酒造）を用い、添付の処方に従い16℃で1時間反応させ連結した。

この連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100μlに加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300μlのHi-Competence Broth（ニッポンジーン）を加え37℃にて1時間インキュベートした後、LBA寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体をLBA培地4mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit（QIAGEN）を用いてプラスミドDNAを調製した。

プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator

Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4(宝酒造) 及びM13 Primer RV(宝酒造) を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

これらヒト型化抗体L鎖バージョン“b”のFR2を置換したバージョン“b1”あるいはバージョン“b2”をコードする遺伝子を含むプラスミドをそれぞれhATR5Lv b1 / CVIDEC及びhATR5Lv b2 / CVIDECと命名した。プラスミドhATR5Lv b1 / CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b1”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b1”アミノ酸配列を配列番号95及び96に示す。また、プラスミドhATR5Lv b2 / CVIDECに含まれるヒト型化L鎖バージョン“b2”の塩基配列及び対応するアミノ酸配列及びバージョン“b2”のアミノ酸配列を配列番号97及び98に示す。

(3) ヒト型化抗体の発現ベクターの構築

(i) ヒト型化H鎖とキメラL鎖との組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv a / CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chATR5 / N5KG4PをNheI及びSalIにて消化することにより調製したchATR5 / N5KG4P (SalI / NheI) に導入した。こうして作製したプラスミドをhHv a - chLv / N5KG4Pと命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドhATR5Hv b / CVIDECをNheI及びSalIで消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、chATR-5抗体発現プラスミドベクター、chA

TR 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v c / C V I D E C 、 h A T R 5 H v d / C V I D E C 及び h A T R 5 H v e / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v c - c h L v / N 5 K G 4 P 、 h H v d - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v e - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v f / C V I D E C 及び h A T R 5 H v h / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v f - c h L v / N 5 K G 4 P 及び h H v h - c h L v / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C 及び h A T R 5 H v j / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、c h A T R - 5 抗体発現プラスミドベクター、c h A T R 5 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した c h A T R 5 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製し

たプラスミドを $hHv i - chLv / N5KG4P$ 及び $hHv j - chLv / N5KG4P$ と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド $hATR5Hvb1 / CVIDEC$ 及び $hATR5Hvd1 / CVIDEC$ を $NheI$ 及び $Sa1I$ で消化し、ヒト型化H鎖V領域のcDNA断片を回収し、 $chATR - 5$ 抗体発現プラスミドベクター、 $chATR5 / N5KG4P$ を $NheI$ 及び $Sa1I$ にて消化することにより調製した $chATR5 / N5KG4P (Sa1I / NheI)$ に導入した。こうして作製したプラスミドを $hHvb1 - chLv / N5KG4P$ 及び $hHvd1 - chLv / N5KG4P$ と命名した。

(ii) ヒト型化L鎖とキメラH鎖との組み合わせ

抗体発現ベクター $N5KG4P$ を用いて、キメラH鎖との組み合わせでヒト型化抗体を発現させることにより、ヒト型化L鎖の評価を行った。

プラスミド $hATR5Lva / CVIDEC$ 、 $hATR5Lv b / CVIDEC$ 、 $hATR5Lvc / CVIDEC$ 、 $hATR5Lv b1 / CVIDEC$ 、 $hATR5Lv b2 / CVIDEC$ を制限酵素 $BglII$ (宝酒造) 及び $SplI$ (宝酒造) により $37^{\circ}C$ で2～3時間消化した。消化混合物を1.5%または2% NuSieve GTG アガロース (FMC BioProducts) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離し、約400bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り出した。アガロース片をフェノール及びクロロホルムで抽出し、DNA断片をエタノールで沈殿させた後、TEに溶解した。

これら各バージョンのヒト型化L鎖V領域をコードする遺伝子を含む $SplI - BglII$ DNA断片と $SplI$ 及び $BglII$ で消化した $chATR5Hv / N5KG4P$ をDNAライゲーションキット *ver. 2* (宝酒造) を用い、添付の処方に従い $16^{\circ}C$ で1時

間反応させ連結した。

連結混合物を大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 μ l に加え、氷上で30分間、42℃にて1分間静置した。次いで300 μ l のHi-Competence Broth(ニッポンジーン)を加え37℃にて1時間インキュベートした後、L B A 寒天培地上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体をL B A 培地250 mlまたは500 mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からPlasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドDNAを調製した。これらキメラH鎖とヒト型化L鎖をコードする遺伝子を導入したプラスミドをそれぞれc h H v - h L v a / N 5 K G 4 P、c h H v - h L v b / N 5 K G 4 P、c h H v - h L v c / N 5 K G 4 P、c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及びc h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

(i i i) ヒト型化H鎖とヒト型化L鎖の組合せ

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v a / C V I D E C をN h e I 及びS a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“a” c D N A の配列を含むプラスミドc h H v - h L v a / N 5 K G 4 P をN h e I 及びS a l I にて消化することにより調製したh L v a / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドをh H v a - h L v a / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミドh A T R 5 H v b / C V I D E C 及びh A T R 5 H v c / C V I D E C をN h e I 及びS a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域のc D N A 断片を回収し、ヒト型化A T R - 5 抗体L鎖バージョン“a” c D N A の配列を含むプラスミドc h H v - h L v a / N 5 K G 4 P をN h e I 及びS a l I にて消化

することにより調製した $hLva/N5KG4P$ ($SalI/NheI$) に導入した。こうして作製したプラスミドを $hHvb-hLva/N5KG4P$ 及び $hHvc-hLva/N5KG4P$ と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド $hATR5Hvb/CVIDEC$ 、 $hATR5Hvd/CVIDEC$ 及び $hATR5Hve/CVIDEC$ を $NheI$ 及び $SalI$ で消化し、ヒト型化H鎖V領域の $cDNA$ 断片を回収し、ヒト型化 $ATR-5$ 抗体L鎖バージョン “b” $cDNA$ の配列を含むプラスミド $chHv-hLv b/N5KG4P$ を $NheI$ 及び $SalI$ にて消化することにより調製した $hLv b/N5KG4P$ ($SalI/NheI$) に導入した。こうして作製したプラスミドを $hHvb-hLv b/N5KG4P$ 、 $hHvd-hLv b/N5KG4P$ 及び $hHve-hLv b/N5KG4P$ と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド $hATR5Hvf/CVIDEC$ 、 $hATR5Hvg/CVIDEC$ 及び $hATR5Hvh/CVIDEC$ を $NheI$ 及び $SalI$ で消化し、ヒト型化H鎖V領域の $cDNA$ 断片を回収し、ヒト型化 $ATR-5$ 抗体L鎖バージョン “b” $cDNA$ の配列を含むプラスミド $chHv-hLv b/N5KG4P$ を $NheI$ 及び $SalI$ にて消化することにより調製した $hLv b/N5KG4P$ ($SalI/NheI$) に導入した。こうして作製したプラスミドを $hHvf-hLv b/N5KG4P$ 、 $hHvg-hLv b/N5KG4P$ 及び $hHvh-hLv b/N5KG4P$ と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド $hATR5Hvi/CVIDEC$ 及び $hATR5Hvj/CVIDEC$ を $NheI$ 及び $SalI$ で消化し、ヒト型化H鎖V領域の $cDNA$ 断片を回収し、ヒト型化 ATR

— 5 抗体 L 鎖バージョン “b” cDNA の配列を含むプラスミド c h H v — h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i — h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v j — h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b 1 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 1 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 A T R — 5 抗体 L 鎖バージョン “b” cDNA の配列を含むプラスミド c h H v — h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b 1 — h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v d 1 — h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b 3 / C V I D E C 及び h A T R 5 H v d 3 / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 A T R — 5 抗体 L 鎖バージョン “b” cDNA の配列を含むプラスミド c h H v — h L v b / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b 3 — h L v b / N 5 K G 4 P 及び h H v d 3 — h L v b / N 5 K G 4 P と命名した。

H 鎖 V 領域を含むプラスミド h A T R 5 H v b / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化 H 鎖 V 領域の cDNA 断片を回収し、ヒト型化 A T R — 5 抗体 L 鎖バージョン “b 1” 及び

“b 2” c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b 1 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) 及び h L v b 2 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v b - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び h H v b - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

H鎖V領域を含むプラスミド h A T R 5 H v i / C V I D E C を N h e I 及び S a l I で消化し、ヒト型化H鎖V領域の c D N A 断片を回収し、ヒト型化 A T R - 5 抗体L鎖バージョン “b 1” 及び “b 2” c D N A の配列を含むプラスミド c h H v - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び c h H v - h L v b 2 / N 5 K G 4 P を N h e I 及び S a l I にて消化することにより調製した h L v b 1 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) 及び h L v b 2 / N 5 K G 4 P (S a l I / N h e I) に導入した。こうして作製したプラスミドを h H v i - h L v b 1 / N 5 K G 4 P 及び h H v i - h L v b 2 / N 5 K G 4 P と命名した。

(4) C O S - 7 細胞へのトランスフェクション

ヒト型化抗体の抗原結合活性及び中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを C O S - 7 細胞で一過性に発現させた。

構築した発現プラスミドベクターを G e n e P u l s e r 装置 (B i o - R a d) を用いてエレクトロポレーションにより C O S - 7 細胞に形質導入した。P B S 中に 1×10^7 細胞 / m l の細胞濃度で懸濁されている C O S - 7 細胞 0.78 m l に、プラスミド 50 μ g あるいは 20 μ g を加え、1,500 V, 25 μ F の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理

された細胞を5%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO) を含有する D M E M 培地(GIBCO) に懸濁し、10 cm 培養皿あるいは15 cm 培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。24時間の培養の後、培養上清を吸引除去し、新たに無血清培地H B C H O (アーバインサイエンティフィック) を加えた。さらに72時間もしくは96時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去した。

(5) 抗体の精製

C O S - 7 細胞の培養上清からの抗体の精製をAffiGel Protein A MAPSIIキット(Bio-Rad)、あるいはrProtein A Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech) を用いて行った。AffiGel Protein A MAPSIIキットを用いた精製はキット添付の処方に従って行った。rProtein A Sepharose Fast Flowを用いた精製は以下のように行った。

1 ml のrProtein A Sepharose Fast Flowをカラムに充填し、10倍量のT B Sを流すことによってカラムを平衡化した。平衡化したカラムにC O S - 7 細胞の培養上清をアプライした後、10倍量のT B Sによってカラムを洗浄した。次に13.5 mlの2.5 mM H C l (p H 3.0) を流すことによって吸着した抗体画分をカラムより溶出した。1.5 mlの1 M T r i s - H C l (p H 8.0) を加えることによって溶出液を中和した。

精製された抗体画分について、セントリプレップ30もしくは100 (a m i c o n) を用いた限外濾過を2~3回行うことにより、T B Sに溶媒を置換し、最終的に約1.5 mlまで濃縮した。

参考例 6. 抗体の定量及び活性評価

(1) E L I S A による抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのE L I S A プレートを次のようにして調製した。E L I S A 用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固

相化バッファー (0.1 M NaHCO_3 、0.02% NaN_3 、pH 9.6) (以下、CBと称す) で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ で固相化し、 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファー (50 mM Tris-HCl、1 mM MgCl_2 、0.1 M NaCl、0.05% Tween 20、0.02% NaN_3 、1% ウシ血清アルブミン (BSA)、pH 8.1) (以下DBと称す) でブロッキングの後、抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートし0.05% Tween 20を含むダルベッコPBS (以下RBと称す) で洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、 $1 \text{mg}/\text{ml}$ となるようにSigma 104 (p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を基質バッファー (50 mM NaHCO_3 、10 mM MgCl_2 、pH 9.8) に溶解したもの (以下、基質溶液と称す) を加え、 $405/655 \text{nm}$ での吸光度をmicroplate reader (Bio Rad) で測定した。濃度測定のスランダーとしてIgG 4 κ (The Binding Site) を用いた。

(2) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82 (ATCC HTB-1) を用いた。細胞培養用96穴プレートの60穴に 1×10^5 個のJ82細胞を播き込んだ。これを CO_2 インキュベーターで1日培養し (10%の牛胎児血清 (GIBCO) を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、 $300 \mu\text{l}$ のPBSで各穴を2回洗浄した。4%のパラホルムアルデヒドを含むPBS (

以下、P F A / P B S と称す) を各穴に $100\ \mu\text{l}$ 加え、氷上で 10 分間静置し、細胞を固相化した。

P F A / P B S を捨て、 $300\ \mu\text{l}$ の P B S で各穴を 2 回洗浄後、 $250\ \mu\text{l}$ の D B でブロッキングした。培養上清あるいは精製抗体を D B にて段階希釈して $100\ \mu\text{l}$ を各穴に加えた。室温にて 2 時間インキュベートし R B で洗浄後、D B で 1000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒト I g G γ 抗体 (BioSource) $100\ \mu\text{l}$ を加えた。室温にて 1 時間インキュベートし R B で洗浄ののち、基質溶液を加え、次に $405/655\ \text{nm}$ での吸光度を Microplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(3) 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体の中和活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) による Factor Xa 産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、 $1.25\ \text{mg/ml}$ の Thromborel S $10\ \mu\text{l}$ と適当な濃度に希釈した抗体 $10\ \mu\text{l}$ に緩衝液 ($5\ \text{mM}$ の CaCl_2 、 0.1% の B S A を含む T B S) $60\ \mu\text{l}$ を加え、 96 穴プレート中で室温で 1 時間反応させた。これに $3.245\ \mu\text{g/ml}$ のヒトファクター X (セルサス・ラボラトリーズ) 及び $82.5\ \text{ng/ml}$ のヒトファクター V I I a (エンザイム・リサーチ) をそれぞれ $10\ \mu\text{l}$ 加え、さらに室温で 1 時間反応させた。

$0.5\ \text{M}$ の E D T A を $10\ \mu\text{l}$ 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を $50\ \mu\text{l}$ 加え、Microplate Reader (Bio Rad) で $405/655\ \text{nm}$ の吸光度を測定した。室温で 1 時間反応させ、再度 $405/655\ \text{nm}$ の吸光度を測定した。抗体無添加の 1 時間の吸光度変化を 100% の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S-2222 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、精製水で 2 倍希釈した後、ポリブレン液 (0.6 mg/ml ヘキサジメチリンブロマイド、SIGMA) と 1 : 1 で混和し調製した。

(4) 活性の評価

(i) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とキメラ L 鎖を組み合わせた抗体 (a-ch) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低下していた。FXa 産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体 (ch-ch) に比べて弱い活性であった。よってヒト型化 H 鎖は FR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は COS-7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(ii) ヒト型化 L 鎖バージョン “a” とキメラ H 鎖との組合せ

ヒト型化 L 鎖バージョン “a” とキメラ H 鎖を組み合わせた抗体 (ch-a) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、キメラ抗体と同等以上の抗原結合活性が認められた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて弱い活性であった。よってヒト型化 L 鎖も FR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体は COS-7 細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(iii) ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とヒト型化 L 鎖バージョン “a” との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “a” とヒト型化 L 鎖バージョン “a” を組み合わせた抗体 (a-a) を作製し、cell ELISA にて抗原結合能を調べたところ、高濃度側で抗原に対する結合量が低

下していた。F X a 産生阻害による抗原中和能についても陽性対照のキメラ抗体に比べてかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖及びL鎖のFR-シャッフリングによるバージョンアップを行うことにした。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(iv) ヒト型化H鎖バージョン“b”、“c”及び“d”とキメラL鎖との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とキメラL鎖を組み合わせた抗体（それぞれ“b-c h”、“c-c h”、及び“d-c h”）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d-c h”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b-c h”及び“c-c h”はわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、“b-c h”はほぼ同等、“d-c h”はわずかに弱い活性であった。またバージョン“c-c h”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”がヒト型化H鎖で高い活性を示すと考えられるバージョンであった。

(v) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“a”を組み合わせた抗体（b-a）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、高濃度で抗原に対する結合量が低下していた。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて、かなり弱い活性であった。よって“b-a”が“a-a”より高い活性を示すバージョンであった。なお、ここで用いたキメラ抗体はCOS-7細胞

で発現させ精製した抗体を用い評価したものである。

(v i) ヒト型化L鎖バージョン“b”、“c”とキメラH鎖との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”をキメラH鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h - b”、“c h - c”）を作製したところ、いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体と同等の活性を示した。よってバージョン“b”及び“c”をヒト型化抗体L鎖の候補とした。マウス抗体由来のアミノ酸残基数が1つ少ないバージョン“b”の方がバージョン“c”より抗原性の点で優れていると考えられる。なお、ここで用いたキメラ抗体はCHO細胞DG44で発現させ精製した抗体を用い評価したもので、これ以降の評価でもこの抗体を陽性対照に用いた。

(v i i) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b”及び“c”と組み合わせた抗体（それぞれ“b - b”及び“b - c”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。いずれの抗体も抗原結合能、抗原中和能ともにキメラ抗体よりわずかに劣る活性を示した。

(v i i i) ヒト型化H鎖バージョン“b”及び“d”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

FR-シャッフリングによってバージョンアップしたヒト型化H鎖とヒト型化L鎖バージョン“b”を組み合わせた抗体（それぞれ“b - b”及び“d - b”）を作製し、cell ELISAにて抗原結合能を調べたところ、“d - b”はキメラ抗体と同等の抗原結合活性が認められ、“b - b”は高濃度でわずかに劣る抗原結合活性を示した。一方、抗原中和能は陽性対照のキメラ抗体に比べて

、“b-b”はわずかに弱い活性で、“d-b”はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よって“b-b”は抗原活性中和能の高いバージョン、“d-b”は抗原結合能の高いバージョンであることが示された。

(ix) ヒト型化H鎖バージョン“e”とキメラL鎖及びヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化L鎖バージョン“e”をキメラL鎖及びヒト型化バージョン“b”と組み合わせた抗体（それぞれ“e-ch”及び“e-b”）を作製したところ、“e-ch”の抗原結合能はキメラ抗体と同等の活性を示したが、“e-b”は抗体の発現量が非常に低く、且つ抗原結合能も殆ど喪失していた。また“e-ch”の抗原活性中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。よってH鎖バージョン“e”はL鎖バージョン“b”との組合せが悪いと考えられた。

(x) ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“f”、“g”及び“h”をヒト型化L鎖バージョン“b”と組み合わせた抗体を（それぞれ“f-b”、“g-b”及び“h-b”）作製したところ、“f-b”及び“h-b”の抗体は抗体の発現量が非常に低かった。なお、バージョン“f”、“h”についてはキメラL鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。“g-b”は低い濃度から飽和状態に達し、キメラ抗体より弱い抗原結合能を示した。“g-b”の抗原中和能は、キメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

(xi) ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”とヒト型化L鎖バージョン“b”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b1”及び“d1”をヒト型化L鎖バ

ージョン “b” と組み合わせた抗体を（それぞれ “b 1 - b” 及び “d 1 - b”）作製したところ、ともに抗体は殆ど発現されなかった。なお、これらについてはキメラ L 鎖と組み合わせた抗体も作製したが、発現されなかった。

（x i i）ヒト型化 H 鎖バージョン “b 3” 及び “d 3” とヒト型化 L 鎖バージョン “b” との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “b 3” 及び “d 3” をヒト型化 L 鎖バージョン “b” と組み合わせた抗体を（それぞれ “b 3 - b” 及び “d 3 - b”）作製したところ、“d 3 - b” の抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っており、“b 3 - b” の抗原結合能はさらに劣っていた。“b 3 - b” の抗原中和能は “b - b” より上回る活性を示したものの、キメラ抗体の活性には及ばず、“d 3 - b” は “b - b” と同程度の活性にとどまった。

（x i i i）ヒト型化 H 鎖バージョン “i” 及び “j” とキメラ L 鎖及びヒト型化 L 鎖バージョン “b” との組合せ

ヒト型化 H 鎖バージョン “i” 及び “j” をキメラ L 鎖と組み合わせた抗体（それぞれ “i - c h” 及び “j - c h”）とヒト型化 L 鎖バージョン “b” と組み合わせた抗体（それぞれ “i - b” 及び “j - b”）を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はいずれの抗体もキメラ抗体とほぼ同等の活性を示した。“i - c h” にはキメラ抗体の活性を上回る抗原中和能が認められ、“j - c h” の抗原中和能はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。“i - b” はキメラ抗体と同等の活性が認められ、“j - b” はキメラ抗体に比べかなり弱い活性であった。

（x i v）ヒト型化 L 鎖バージョン “b 1” 及び “b 2”

ヒト型化 L 鎖バージョン “b 1” 及び “b 2” をキメラ H 鎖と組み合わせた抗体（それぞれ、“c h - b 1” 及び “c h - b 2”）

を作製したところ、いずれの抗体もキメラ抗体と同等の抗原結合能を示した。抗原中和能については、“c h - b 1”ではキメラ抗体と同等の活性を示し、“c h - b 2”では高濃度側でキメラ抗体を若干上回る活性が認められた。バージョン“b 1”及び“b 2”ともにヒト型化抗体L鎖の候補になり得るが、より強い活性を有するという点でバージョン“b 2”の方が優れている。

(x v) ヒト型化H鎖バージョン“b”とヒト型化L鎖バージョン“b 2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“b”をヒト型化L鎖バージョン“b 2”と組み合わせた抗体(“b - b 2”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。抗原結合能はキメラ抗体よりわずかに劣っていた。抗原中和能は“b - b”の活性を上回ったものの、“i - b”の活性には及ばなかった。

(x v i) ヒト型化H鎖バージョン“i”とヒト型化L鎖バージョン“b 1”又は“b 2”との組合せ

ヒト型化H鎖バージョン“i”をヒト型化L鎖バージョン“b 1”又は“b 2”と組み合わせた抗体(それぞれ“i - b 1”及び“i - b 2”)を作製し、抗原結合能及び抗原中和能を測定した。“i - b 2”の抗原結合能はキメラ抗体とほぼ同等で、“i - b 1”はわずかに劣る程度であった。また、“i - b 1”及び“i - b 2”の抗原中和能はキメラ抗体や“i - b”を上回る活性を示し、“i - b 2” > “i - b 1”の順に強かった。

参考例 7. C H O細胞産生ヒト型化抗体の作製及び活性評価

(1) C H O安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体(b - b、i - b及びi - b 2)の安定産生細胞株を樹立するため、無血清培地に馴化したC H O細胞(D G 4 4)に抗体発現遺伝子ベクターを導入した。

プラスミドDNA、 $hHvb-hLv b/N5KG4P$ 、 $hHvi-hLv b/N5KG4P$ 及び $hHvi-hLv b2/N5KG4P$ を制限酵素SspI（宝酒造）で切断して直鎖状にし、フェノール及びクロロフォルム抽出した後、エタノール沈殿により精製した。エレクトロポレーション装置（Gene Pulser；Bio Rad）により、直鎖状にした発現遺伝子ベクターをDG44細胞に導入した。DG44細胞をPBSに $1 \times 10^7 / ml$ の細胞密度で懸濁し、この懸濁液約0.8 mlに前記のDNAを10もしくは $50 \mu g$ を加え、1,500 V、 $25 \mu F$ の静電容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、ヒポキサンチン-チミジン（GIBCO）（以下、HT）を含有するCHO-S-SFMII培地に処理された細胞を懸濁し、2枚の96穴平底プレート（Falcon）に $100 \mu l / 穴$ となるように播種し、CO₂インキュベーターにて培養した。培養開始8～9時間後にHT及び $1 mg / ml$ のGENETICIN（GIBCO）を含有するCHO-S-SFMII培地を $100 \mu l / 穴$ 加え、 $500 \mu g / ml$ のGENETICIN選択培地に変換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。3～4日に一度1/2量の培地を新鮮な培地と交換し、選択培地への変換から約2週間経過した時点で、その4～5日後に細胞の順調な増殖が観察された穴の培養上清の一部を回収した。この培養上清中に発現された抗体濃度を前述の抗体濃度測定ELISAにより測定し、抗体産生量の高い細胞を選出した。

（2）ヒト型化抗体の大量精製

前記のように選出したヒト型化抗体（“b-b”、“i-b”及び“i-b2”）発現DG44細胞株を2Lローラーボトル（CONING）を用い、 $500 ml / ボトル$ のCHO-S-SFMII培地中で

数日培養後、培養液を回収して新鮮なCHO-S-SFMII培地を加え、再び培養した。培養液は遠心分離により細胞破片を除去し、 $0.22\mu\text{m}$ もしくは $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過した。これを繰り返し、それぞれ全量約2Lの培養上清を得た。得られた培養上清をProtein Aアフィニティーカラム(Poros)を接続したConSep LC100システム(ミリポア)にて抗体を精製した。

(3) ELISAによる抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴をCBで $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) $100\mu\text{l}$ で固相化し、 $200\mu\text{l}$ のDBでブロッキングの後、抗体を発現させたCHO細胞の培養上清あるいは精製抗体をDBにて段階希釈して各穴に加えた。

1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) $100\mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしRBで洗浄の後、基質溶液を $100\mu\text{l}$ 加え、 $405/655\text{nm}$ での吸光度をmicroplate reader(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスランダーとしてIgG4 κ (The Binding Site)を用いた。

(4) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのCell ELISAプレートでは、次のようにして調製した。細胞はヒト膀胱癌細胞J82(ATCC HTB-1)を用いた。細胞培養用96穴プレートに 1×10^5 個のJ82細胞を播き込んだ。これをCO₂インキュベーターで1日培養し(10%の牛胎児血清(GIBCO)を含むRPMI 1640培地)、細胞を接着させた。培養液を捨て、PBSで各穴を2回洗

浄した。PFA/PBSを各穴に100 μ l加え、氷上で10分間静置し、細胞を固相化した。

PFA/PBSを捨て、300 μ lのPBSで各穴を2回洗浄後、250 μ lのDBでブロッキングした。精製抗体を上測定結果をもとに、DBにて10 μ g/mlより公比2で段階希釈して100 μ lを各穴に加えた。室温にて2時間インキュベートしRBで洗浄後、DBで1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG γ 抗体(BioSource) 100 μ lを加えた。室温にて1時間インキュベートしRBで洗浄ののち、基質溶液を100 μ l加え、次に405/655nmでの吸光度をMicroplate Reader (Bio-Rad) で測定した。

(5) TF中和活性(ファクターXa産生阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のファクターXa産生阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG)によるFactor Xa産生阻害活性を指標に測定した。すなわち、5mg/mlのThromborel S 10 μ lと抗体10 μ lに緩衝液(5mMのCaCl₂、0.1%のBSAを含むTBS) 60 μ lを加え、96穴プレート中で室温で1時間反応させた。抗体は緩衝液で200 μ g/mlより公比5で段階希釈した。

これに3.245 μ g/mlのヒトファクターX(セルサス・ラボラトリーズ)及び82.5ng/mlのヒトファクターVIIa(エンザイム・リサーチ)をそれぞれ10 μ l加え、さらに室温で45分間反応させた。0.5MのEDTAを10 μ l加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を50 μ l加え、Microplate Reader (Bio Rad) で405/655nmの吸光度を測定した。室温で30分間反応させ、再度405/655nmの吸光度を測定した。抗体無添加の30分間の吸光度変化を100%の活性とし、それぞ

れの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S - 2 2 2 2 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0. 6 m g / m l ヘキサジメチリンブロマイド、S I G M A) と 1 : 1 で混和し調製した。

(6) T F 中和活性 (ファクター X 結合阻害活性) の測定

ヒト型化抗体のファクター X 結合阻害活性は、ヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S (Behringwerke AG) を用い、予め T F と F a c t o r V I I a の複合体を形成させ、その複合体の F a c t o r X a 産生阻害活性を指標にファクター X 結合阻害活性を測定した。すなわち、5 m g / m l の Thromborel S 1 0 μ l と 8 2. 5 n g / m l のヒト F a c t o r V I I a (エンザイム・リサーチ) 1 0 μ l に緩衝液 (5 m M の C a C l 2、0. 1 % の B S A を含む T B S) 6 0 μ l を加え、9 6 穴プレート中で室温で予め 1 時間反応させた。

これに抗体溶液を 1 0 μ l 加え、室温で 5 分間反応させた後、3. 2 4 5 μ g / m l のヒト F a c t o r X (セルサス・ラボラトリーズ) を 1 0 μ l 加え、さらに室温で 4 5 分間反応させた。なお抗体は緩衝液で 2 0 0 μ g / m l より公比 2 で段階希釈した。0. 5 M の E D T A を 1 0 μ l 加え、反応を停止させた。これに発色基質溶液を 5 0 μ l 加え、M i c r o p l a t e R e a d e r (B i o R a d) で 4 0 5 / 6 5 5 n m の吸光度を測定した。室温で 3 0 分間反応させ、再度 4 0 5 / 6 5 5 n m の吸光度を測定した。抗体無添加の 3 0 分間の吸光度変化を 1 0 0 % の活性とし、それぞれの吸光度変化から残存活性 (%) を算出した。

発色基質溶液はテストチーム発色基質 S - 2 2 2 2 (Chromogenix) を添付文書に従い溶解し、ポリブレン液 (0. 6 m g / m l ヘ

キサジメチリンブロマイド、SIGMA)と1:1で混和し調製した。

(7) TF中和活性(血漿凝固阻害活性)の測定

ヒト型化抗体のTF中和活性(血漿凝固阻害活性)はヒト胎盤由来トロンボプラスチン、Thromborel S(Behringwerke AG)を用いたプロトロンビン時間を指標に測定した。すなわち、サンプルカップにヒト血漿(コスモ・バイオ)100 μ lを入れ、これに様々な濃度に希釈した抗体を50 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで3分間加温した。予め37 $^{\circ}$ Cに加温しておいた1.25mg/mlのThromborel Sを50 μ l加え、血漿凝固を開始させた。この凝固時間はAmelung CR-Aを接続したAmelung KC-10A(ともにエム・シー・メディカル)にて測定した。

抗体は80 μ g/mlより公比2で0.1%のBSAを含有するTBS(以下、BSA-TBS)にて段階希釈した。測定した抗体無添加の凝固時間を100%のTF血漿凝固活性とし、Thromborel Sの濃度と凝固時間をプロットした検量線により抗体を添加した際のそれぞれの凝固時間からTF残存活性を算出した。

検量線は様々なThromborel Sの濃度とその凝固時間を測定することにより作成した。適当に希釈したThromborel S、50 μ lに50 μ lのBSA-TBSを加え、37 $^{\circ}$ Cで3分間加温し、予め37 $^{\circ}$ Cに加温しておいたヒト血漿を100 μ l加えて凝固を開始させ凝固時間を測定した。Thromborel Sは6.25mg/mlより公比2で25mMのCaCl₂を含むハanks緩衝液(GIBCO)にて段階希釈した。横軸にThromborel S濃度、縦軸に凝固時間を両対数グラフにプロットし、これを検量線とした。

(8) 活性の評価

“b-b”、“i-b”及び“i-b₂”のヒト型化抗体すべて

はキメラ抗体と同等以上の活性を有していた（図 1）。Factor Xa 産生阻害活性、Factor X 結合阻害活性及び血漿凝固阻害活性においても、ヒト型化抗体 “b-b”、“i-b” 及び “i-b 2” はキメラ抗体と同等以上の活性を有しており、“i-b 2” > “i-b” > “b-b” の順に活性が強かった（図 2、3 及び 4）。

請 求 の 範 囲

1. ヒト組織因子 (TF) 又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されていて該遺伝子を発現することができる動物細胞が移植されている実験動物であって、血液凝固亢進状態が長期間持続する非ヒト動物。

2. 前記ヒト組織因子の一部が、細胞内領域を欠くヒト組織因子である、請求項 1 に記載の動物。

3. 前記動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の動物。

4. 前記哺乳動物細胞がヒト骨髓腫細胞である、請求項 3 に記載の動物。

5. 前記動物が、マウスである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の動物。

6. 前記血液凝固亢進状態が、ヒト組織因子血漿中濃度の上昇、血小板の減少、フィブリノーゲンの減少、可溶性フィブリンモノマー複合体濃度の上昇及びトロンビン-アンチトロンビン III 複合体濃度の上昇の少なくとも 1 つの現象により表わされる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の動物。

7. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の動物の作製方法において、ヒト組織因子 (TF) 又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されており該遺伝子を発現することができる動物細胞を非ヒト実験動物に移植し、そして血液凝固亢進状態が持続する動物を選択することを特徴とする方法。

8. 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の動物を用いることを特徴とする抗血栓薬のスクリーニング方法。

9. ヒト組織因子 (ヒト TF) に対する抗体を含んで成る、血液

凝固亢進状態が持続している疾患の予防又は治療剤。

10. 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項9に記載の予防又は治療剤。

11. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項9に記載の予防又は治療剤。

12. 前記抗体が組換え型抗体である、請求項9又は11に記載の予防又は治療剤。

13. 前記抗体が改変抗体である、請求項9又は12に記載の予防又は治療剤。

14. 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項9, 12又は13に記載の予防又は治療剤。

15. 前記ヒト型化抗体が、バージョン $b-b$, $i-b$ 、又は $i-b_2$ のヒト型化抗体である、請求項14に記載の予防又は治療剤。

16. 前記抗体が抗体修飾物である、請求項9又は12~15のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

17. 前記抗体修飾物が、抗体断片 Fab , $F(ab')_2$ 、もしくは Fv 、又はシングルチェーン $Fv(scFv)$ である、請求項16に記載の予防又は治療剤。

18. ヒト組織因子（ヒトTF）に対する抗体を含んで成る、感染症に起因する血液凝固亢進状態の予防又は治療剤。

19. 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項18に記載の予防又は治療剤。

20. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項18に記載の予防又は治療剤。

21. 前記抗体が組換え型抗体である、請求項18又は20に記載の予防又は治療剤。

22. 前記抗体が改変抗体である、請求項18又は21に記載の予防又

は治療剤。

23. 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項18, 21又は22に記載の予防又は治療剤。

24. 前記ヒト型化抗体が、バージョン $b-b$, $i-b$ 、又は $i-b_2$ のヒト型化抗体である、請求項23に記載の予防又は治療剤。

25. 前記抗体が抗体修飾物である、請求項18又は21~24のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

26. 前記抗体修飾物が、抗体断片 Fab , $F(ab')_2$ 、もしくは Fv 、又はシングルチェーン $Fv(scFv)$ である、請求項25に記載の予防又は治療剤。

27. ヒト組織因子(ヒトTF)に対する抗体を含んで成る、静脈血栓症の予防又は治療剤。

28. 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項27に記載の予防又は治療剤。

29. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項27に記載の予防又は治療剤。

30. 前記抗体が組換え型抗体である、請求項27又は29に記載の予防又は治療剤。

31. 前記抗体が改変抗体である、請求項27又は30に記載の予防又は治療剤。

32. 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項27, 30又は31に記載の予防又は治療剤。

33. 前記ヒト型化抗体が、バージョン $b-b$, $i-b$ 、又は $i-b_2$ のヒト型化抗体である、請求項32に記載の予防又は治療剤。

34. 前記抗体が抗体修飾物である、請求項27又は30~33のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

35. 前記抗体修飾物が、抗体断片 Fab , $F(ab')_2$ 、もしくは

はF v、又はシングルチェーンF v (s c F v) である、請求項34に記載の予防又は治療剤。

36. ヒト組織因子(ヒトTF)に対する抗体を含んで成る、動脈血栓の予防又は治療剤。

37. 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項36に記載の予防又は治療剤。

38. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項36に記載の予防又は治療剤。

39. 前記抗体が組換え型抗体である、請求項36又は38に記載の予防又は治療剤。

40. 前記抗体が改変抗体である、請求項36又は39に記載の予防又は治療剤。

41. 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項36、39又は40に記載の予防又は治療剤。

42. 前記ヒト型化抗体が、バージョンb-b, i-b、又はi-b 2のヒト型化抗体である、請求項41に記載の予防又は治療剤。

43. 前記抗体が抗体修飾物である、請求項36又は39～42のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

44. 前記抗体修飾物が、抗体断片F a b, F (a b')₂、もしくはF v、又はシングルチェーンF v (s c F v) である、請求項43に記載の予防又は治療剤。

45. ヒト組織因子(ヒトTF)に対する抗体を含んで成る、血管中膜肥厚に起因する疾患の予防又は治療剤。

46. 前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項45に記載の予防又は治療剤。

47. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項45に記載の予防又は治療剤。

48. 前記抗体が組換え型抗体である、請求項45又は47に記載の予防又は治療剤。

49. 前記抗体が改変抗体である、請求項45又は48に記載の予防又は治療剤。

50. 前記改変抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である、請求項45、48又は49に記載の予防又は治療剤。

51. 前記ヒト型化抗体が、バージョン $b-b$ 、 $i-b$ 、又は $i-b_2$ のヒト型化抗体である、請求項50に記載の予防又は治療剤。

52. 前記抗体が抗体修飾物である、請求項43又は48～51のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

53. 前記抗体修飾物が、抗体断片 Fab 、 $F(ab')_2$ 、もしくは Fv 、又はシングルチェーン $Fv(scFv)$ である、請求項52に記載の予防又は治療剤。



Fig.1

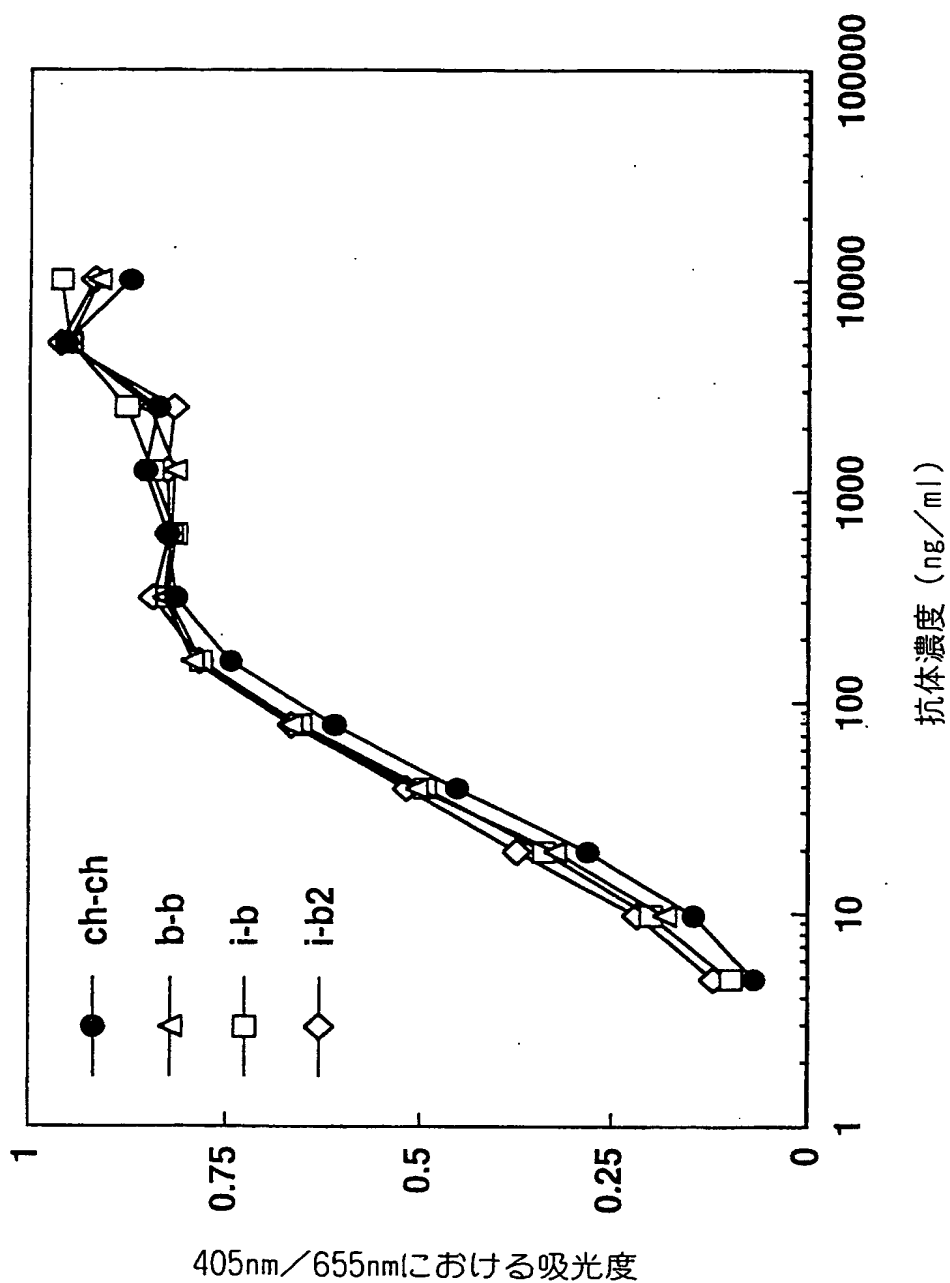




Fig. 2

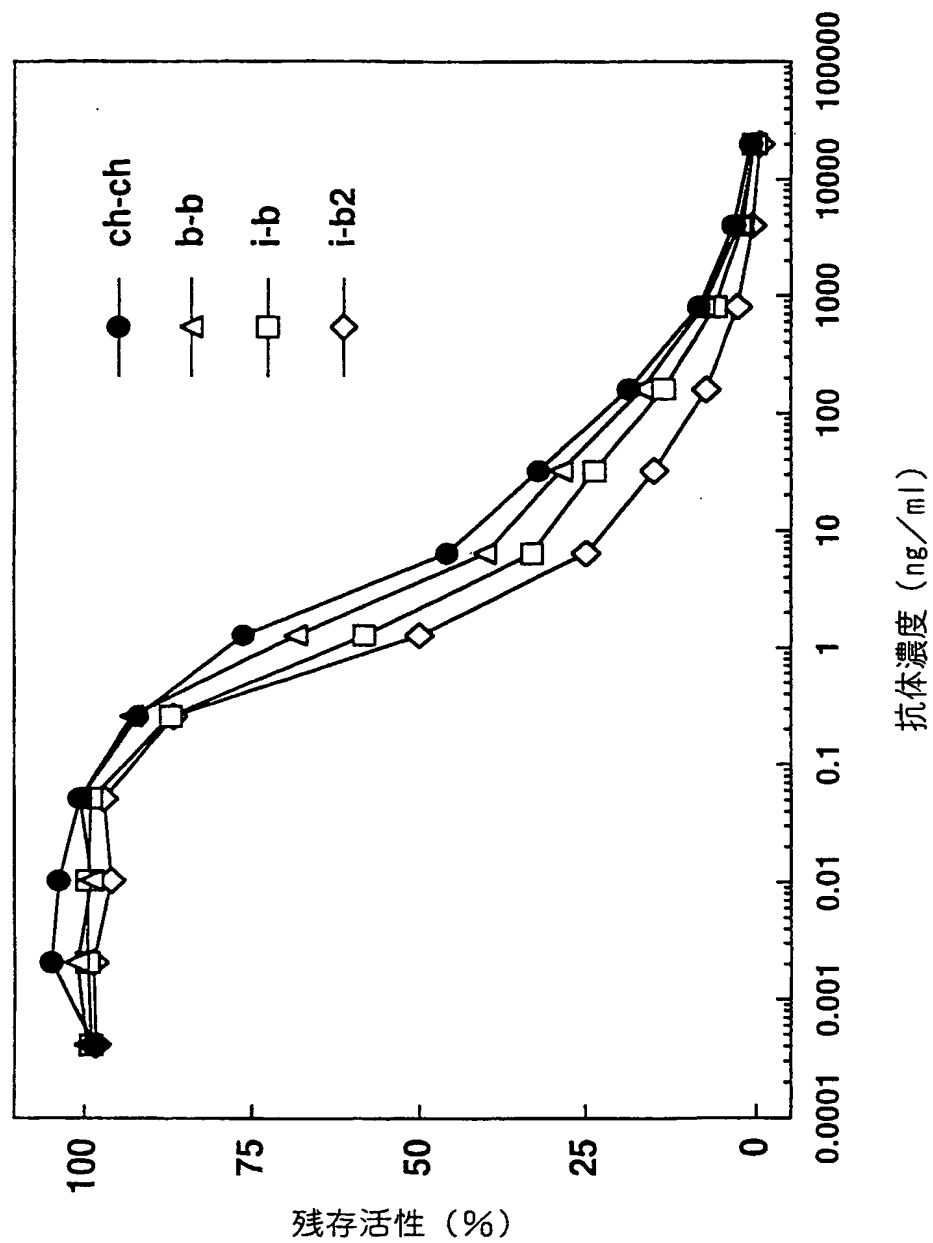




Fig. 3

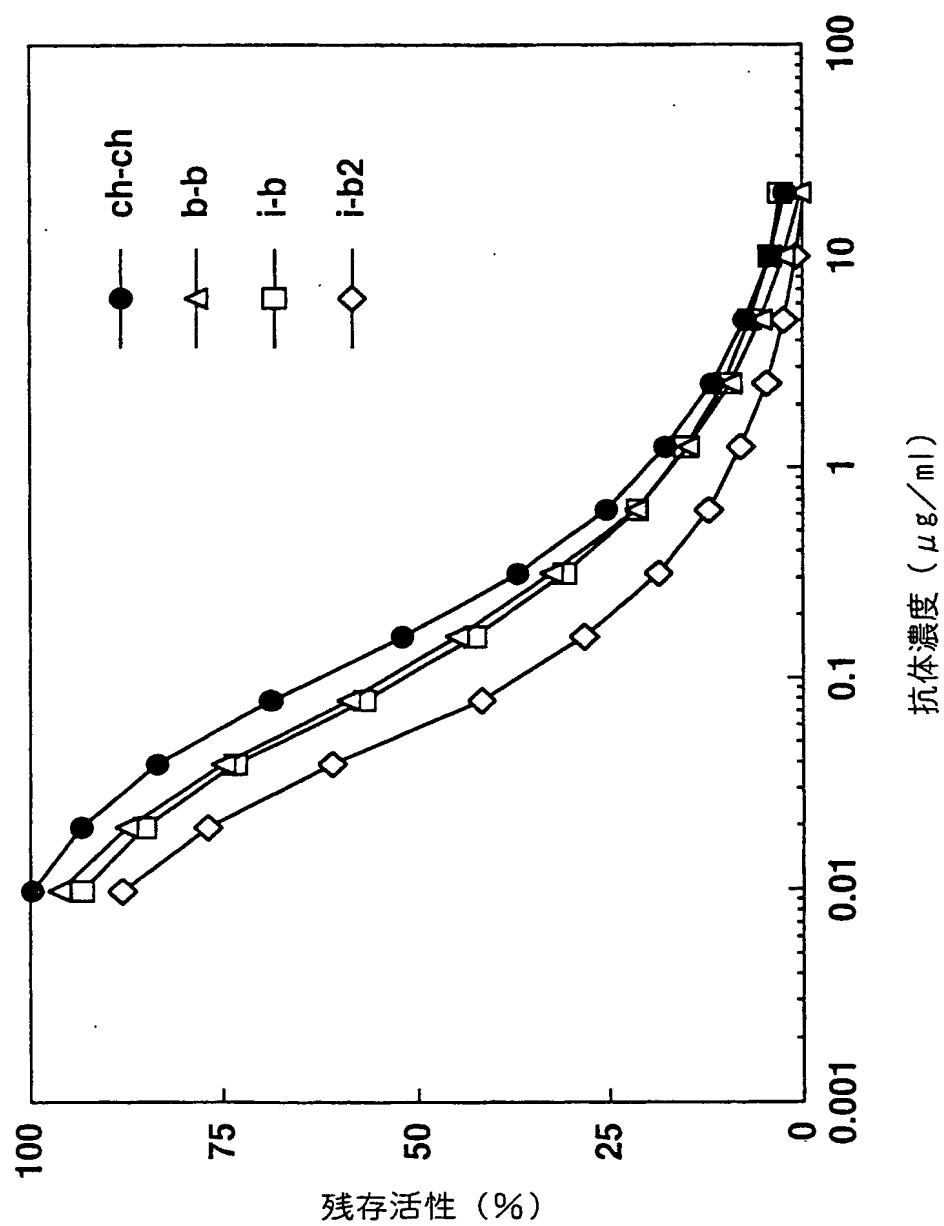




Fig. 4

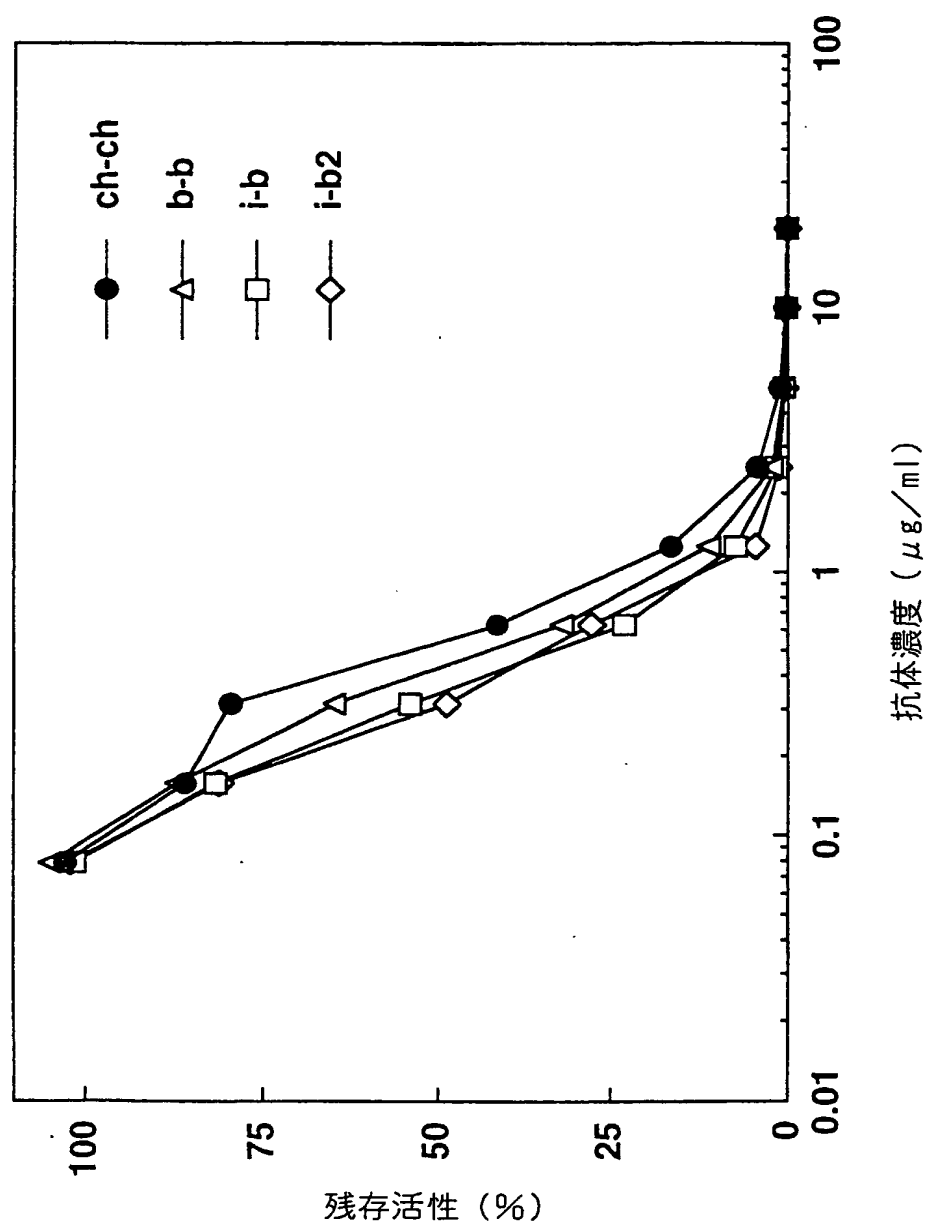




Fig. 5

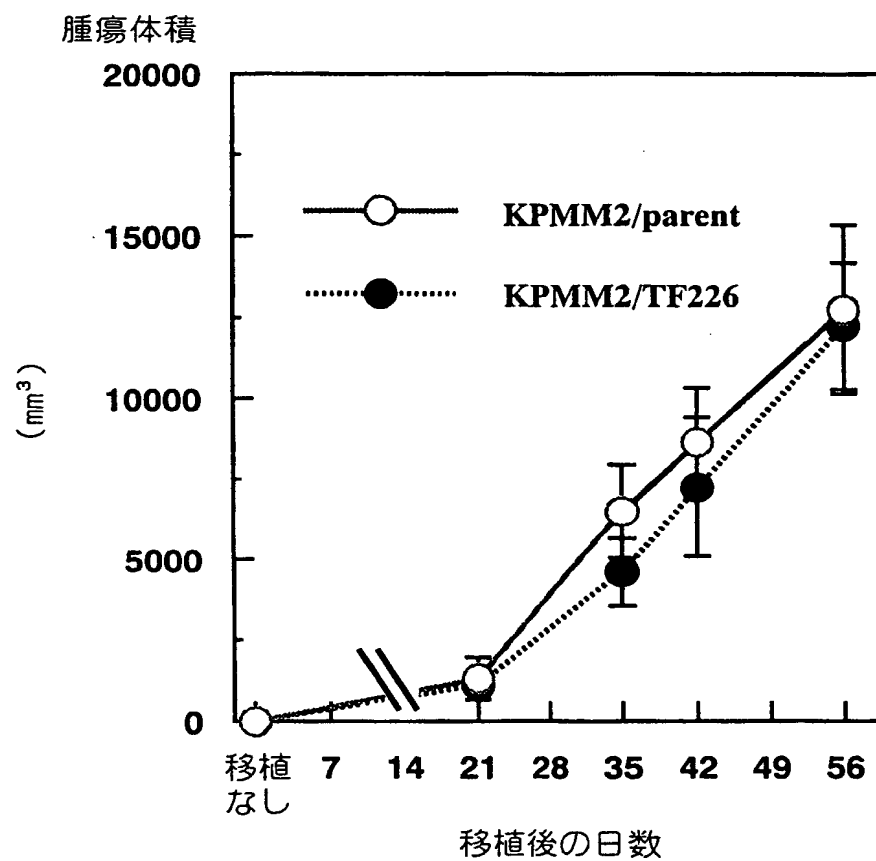




Fig. 6

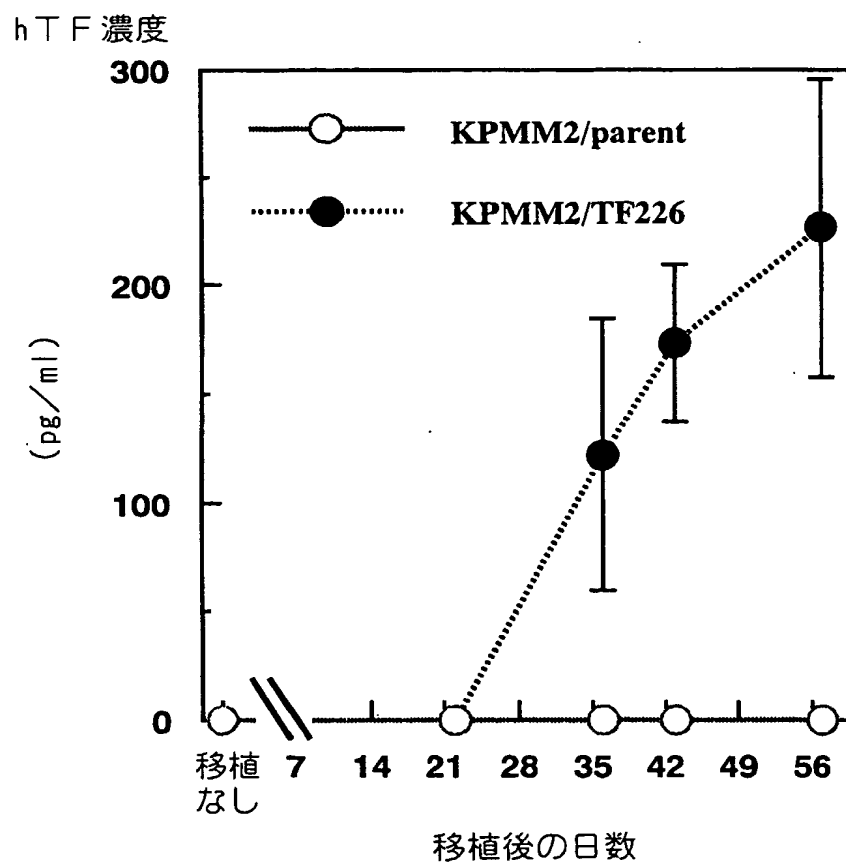




Fig.7

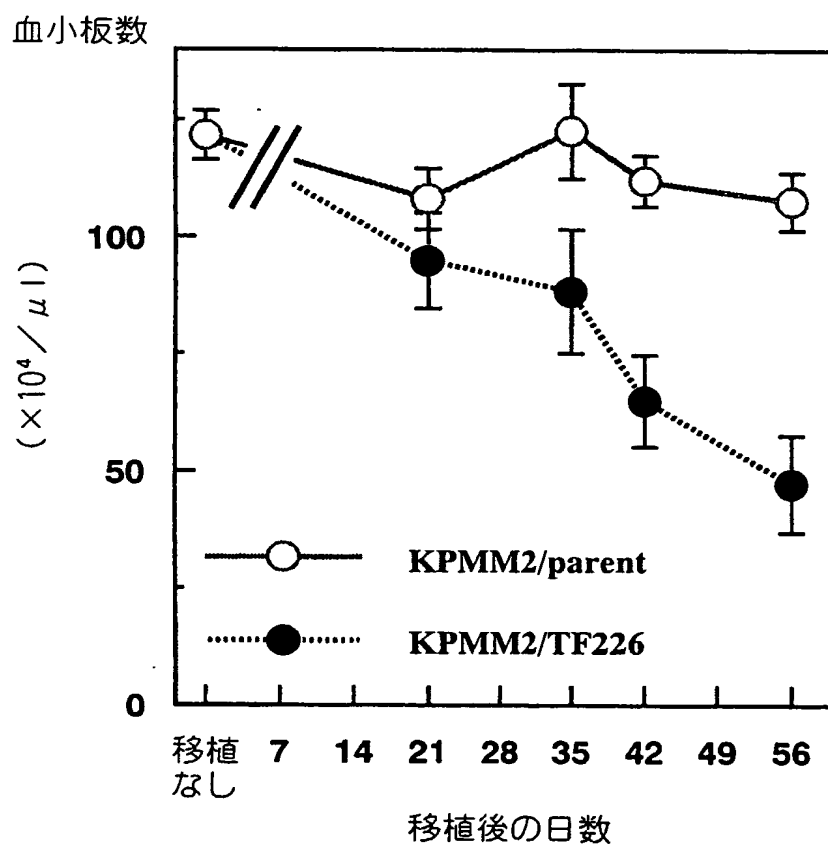




Fig. 8

フィブノーゲン

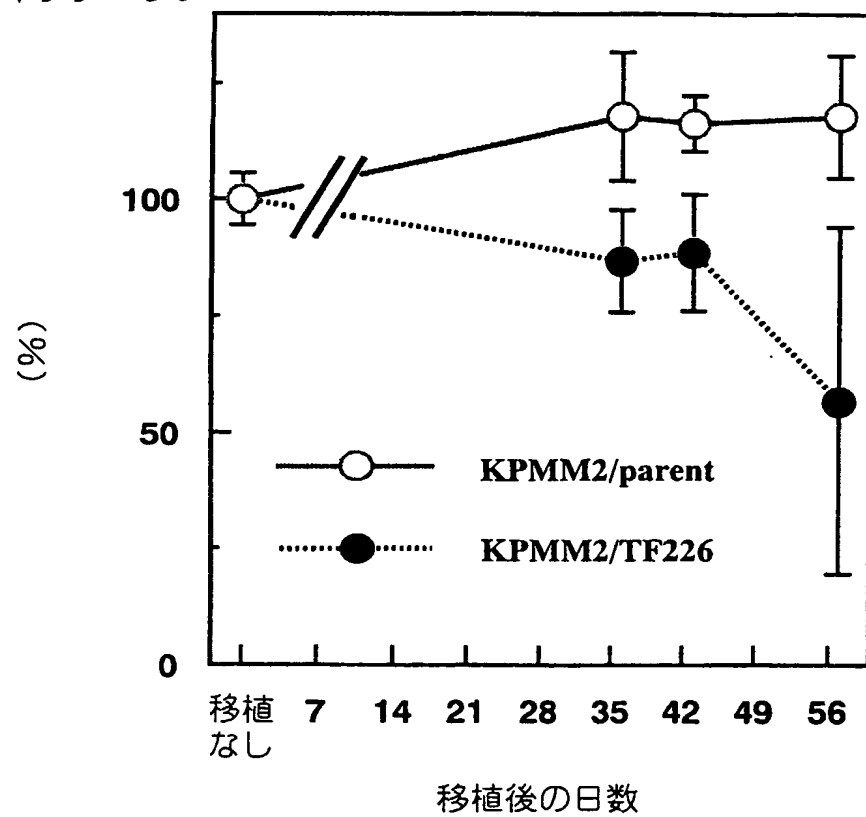




Fig.9

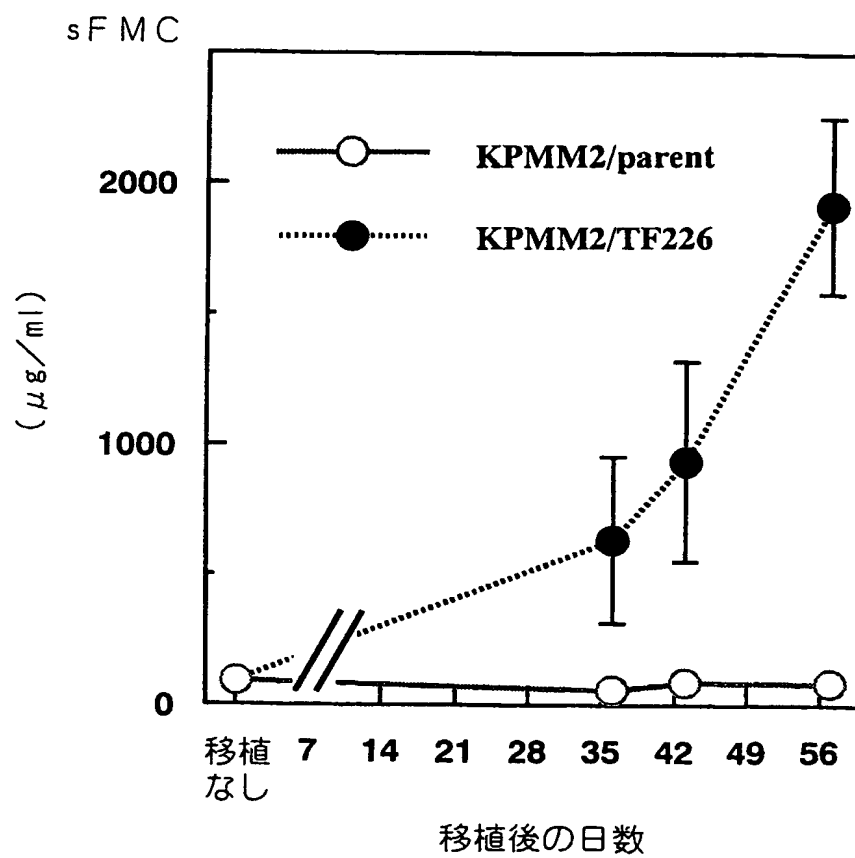




Fig.10

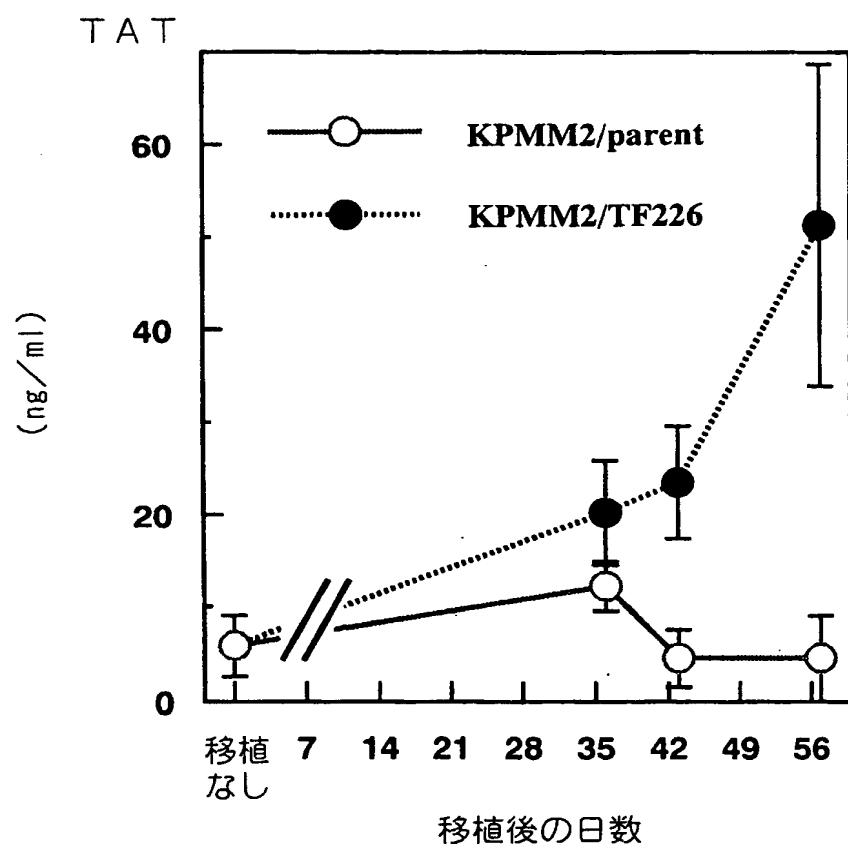




Fig.11

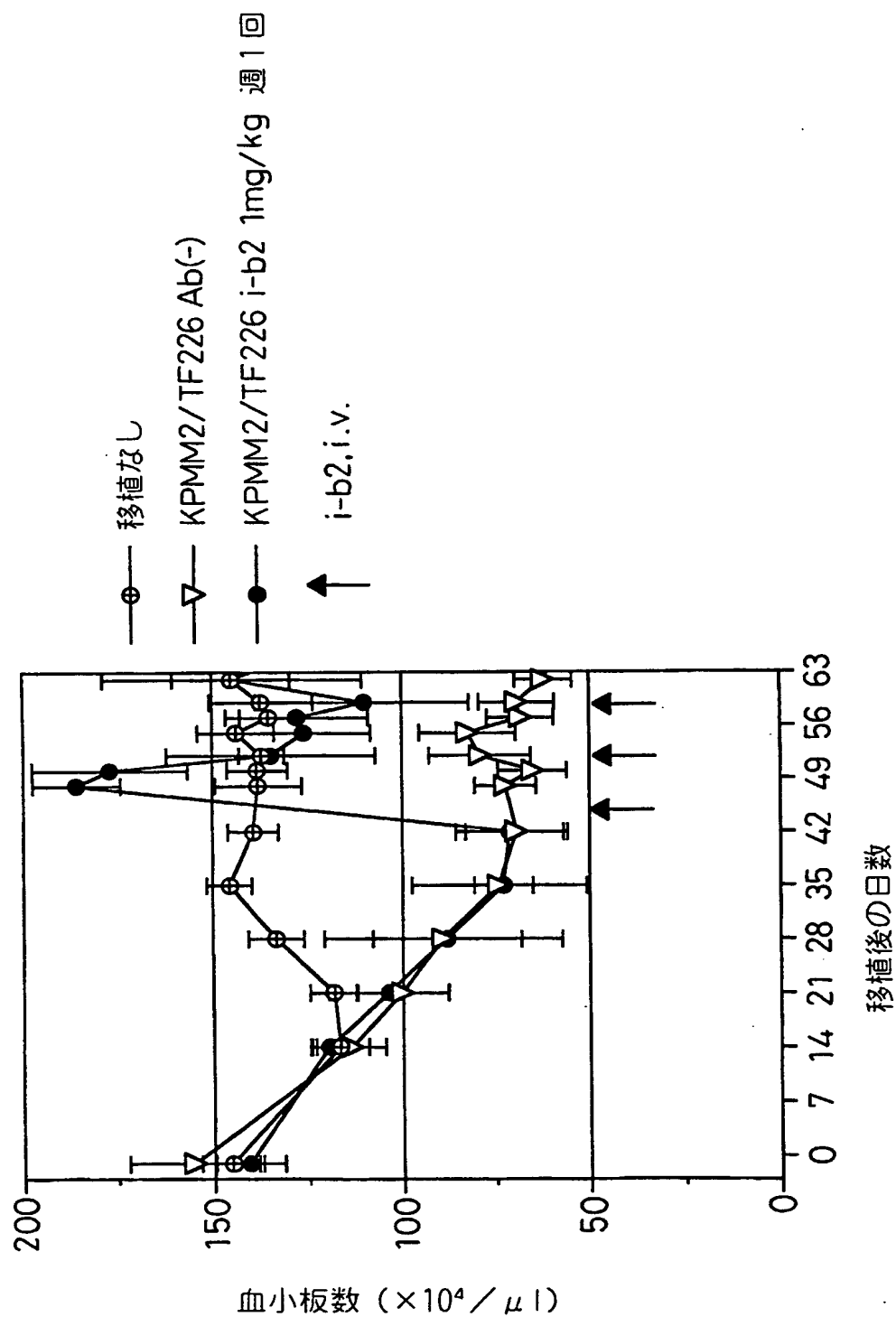




Fig.12

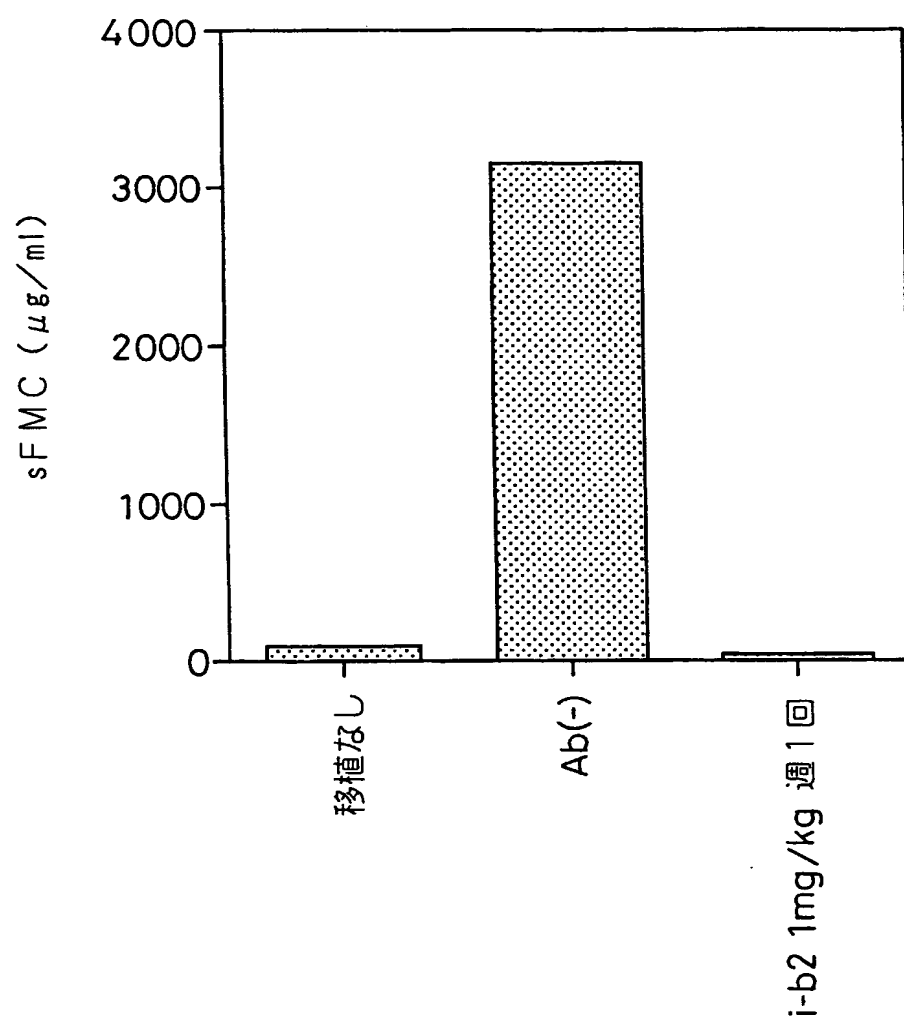




Fig.13

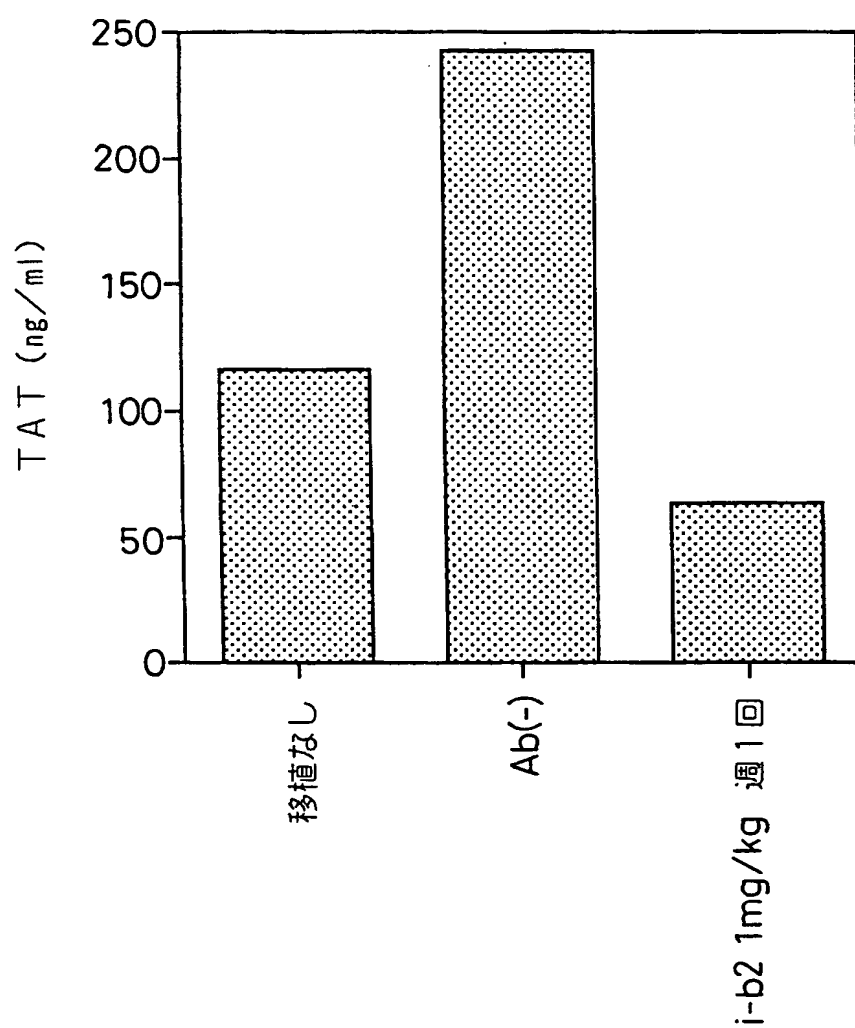
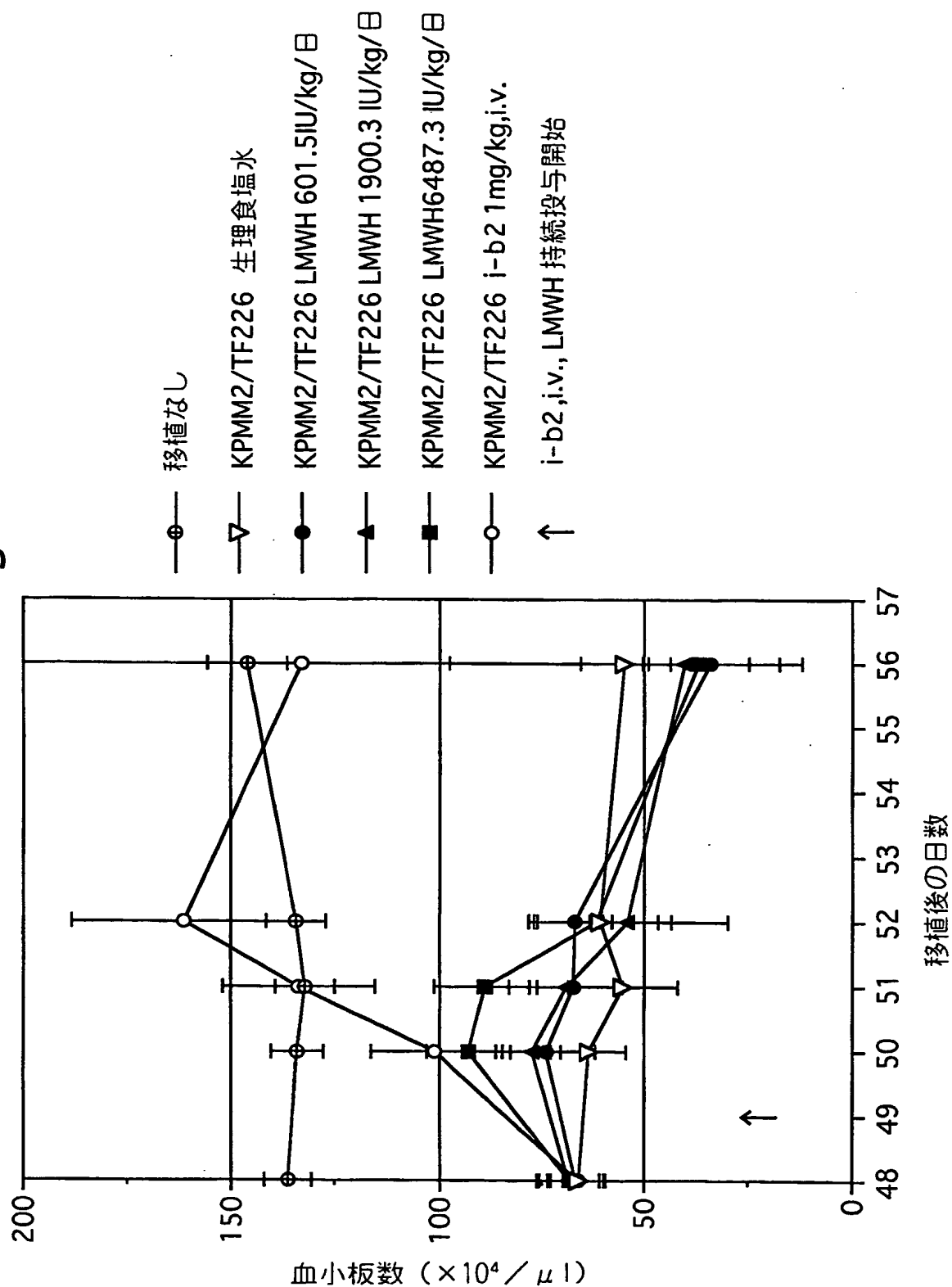




Fig.14





SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Prophylactic or therapeutic agent for blood coagulation-related diseases

<130> H795-PCT

<160> 104

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MHC-G1

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MKC

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> M13 Primer M4

<400> 3

gttttcccag tcacgac

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> M13 Primer RV

<400> 4

caggaaacag ctatgac

17

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(408)

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 5

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg

48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5



gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg 96

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg

1

5

10

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att 144

Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

65

70

75

aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc 336

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

110

115

<210> 6

<211> 381

<212> DNA



<213> Mouse

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region of anti-TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 6

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr

1 5 10

gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60



aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn

65

70

75

aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt 336

Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95

100

105

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HS

<400> 7

gtctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcac

35

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5HA

<400> 8

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga

28

<210> 9

<211> 35



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LS

<400> 9

gtctagatct ccacatgag ggcccctgct cagtt

35

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer ch5LA

<400> 10

tgctcgtagc ttttatttcc agcttggt

28

<210> 11

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv1S

<400> 11

ttctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcatttct tcctgatggc agtggttaca 60

ggggttaact cacaggtgca gctgttggag tctggagctg tgct 104

<210> 12

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv28

<400> 12

acaggtgcag ctgttggagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt ccgtgaagat 60

ctcctgcaag gcttccggat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

<210> 13

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv4S

<400> 13

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60

atccgccagt attgcctact tggagttctc gaggcctgaca aatgagga 108

<210> 14

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv3A

<400> 14

tcatacatatc tatggccatt cgcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60

ggcctctgtt ttacccaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

<210> 15

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> CDR grafting primer hR5Hv5A

<400> 15

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttggcc ccagtagtcc atggcatagc 60

ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgcag aatcctcatt tgtcaggctc 110

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrS

<400> 16

ttctgtcgac ccaccatga 19

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer hR5HvPrA

<400> 17

agaagctagc tgaggagac 19

<210> 18

<211> 415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide



<222> (1)...(37)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(415)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanized H chain V region

<400> 18

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser

65

70

75



att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc 336

Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 415

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized H chain V region

<400> 19

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr

65

70

75

80



Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 20

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFS

<400> 20

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatc actgcagaca 60

catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

<210> 21

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBS

<400> 21

ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct 75

<210> 22

<211> 100

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFFA

<400> 22

ctcagactcg agagctccat gtaggctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60

cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3RFBA

<400> 23

agaacatgg catagcccga gtctcttgca cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60

agactcgaga gctcc 75

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFS

<400> 24

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60

catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

<210> 25

<211> 75

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBS

<400> 25

gaggctctcg agtgtgacag ccgcggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60
ctatgccatg gttct 75

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMFA

<400> 26

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtctaccag cattgtgact 60
cggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 27

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3NMBA

<400> 27

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cgcggctgtc 60
acactcgaga gcctc 75

<210> 28

<211> 414

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanized H chain V region

<400> 28

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60



ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 29

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized H chain V region

<400> 29

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45



Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 30

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanize
d H chain V region

<400> 30

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg

48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5



gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
1 5 10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
15 20 25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
50 55 60
ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75
cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta 336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
80 85 90
tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115

<210> 31

<211> 119

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized H chain V region

<400> 31

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 32

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPS



<400> 32

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg 60
aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

<210> 33

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3EPA

<400> 33

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc 60
agactcgaga gctcc 75

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 34

ttcttggcca tagtatgtat 20

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 35



agaaccatgg catagccc

<210> 36

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3VHS

<400> 36

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtctcgatt accgcggacg 60

agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag 100

<210> 37

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3VHA

<400> 37

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60

agactgttga gctcc 75

<210> 38

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>



<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d" of humanized H chain V region

<400> 38

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90



tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d" of humanized H chain

<400> 39

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95



Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 40

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "e" of humanize
d H chain V region

<400> 40

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25



aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
50 55 60
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys
65 70 75
ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt 336
Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "e" of humanized H chain V region

<400> 41



Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 42

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSS

<400> 42

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60

catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

<210> 43

<211> 75



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3SSA

<400> 43

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaatata cggccgtgtc gtcagatctc 60

aggctcctga gctcc 75

<210> 44

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDS

<400> 44

ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60

aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

<210> 45

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3CDA

<400> 45

agaaccatgg catagcccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatcgt 60

aggctcgaga gttgc 75

<210> 46

<211> 414



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "f" of humanized H chain V region

<400> 46

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60



ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "f" of humanized H chain V region

<400> 47

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45



Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 48

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "g" of humanize
d H chain V region

<400> 48

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5



gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
1 5 10
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
15 20 25
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
50 55 60
ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc 288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser
65 70 75
aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
80 85 90
tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115
<210> 49
<211> 119
<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "g" of humanized H chain V region

<400> 49

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 50

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADS



<400> 50

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggccg cgtcaccatg tcagccgaca 60
agtcctccag cgccgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

<210> 51

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3ADA

<400> 51

agaacatgg catagcccga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgc cgaggcctta 60
aggctgggtcc actgt 75

<210> 52

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "h" of humanize
d H chain

<400> 52



atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata	336
Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile	
80 85 90	
tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	



<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "h" of humanized H chain V region

<400> 53

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 54

<211> 100

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMS

<400> 54

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgcggaca 60
catcgacgag cacagtcttc atggaactga gcagcctgag 100

<210> 55

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3MMA

<400> 55

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60
aggctgctca gttcc 75

<210> 56

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMS

<400> 56

ttcttggcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcaccttt accgcggaca 60
catccgcgaa cacagcctac atggagtga ggagcctcag 100

<210> 57

<211> 75

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR Shuffling primer F3BMA

<400> 57

agaaccatgg catagcccga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60
aggctcctca actcc 75

<210> 58

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "i" of humanize
d H chain V region

<400> 58

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10



cct ggg act tcc ggg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

65

70

75

aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg 336

Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "i" of humanized H chain



n V region

<400> 59

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 60

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (57)

<220>

<221> mat-peptide



<222> (58)... (414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "j" of humanized H chain V region

<400> 60

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg gct gtt 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val

80

85

90



tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "j" of humanized H chain V region

<400> 61

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 62

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPS

<400> 62

ttctatgcat tgggtgcgcc aggctccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaatga 60

tcctgcgaat ggccattct 79

<210> 63

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2MPA

<400> 63

agaatggcca ttcgcaggat cattccctcc catccactcc aggccctgtc ctggagcctg 60

gcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 64

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humaniz

ed H chain V region

<400> 64

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65

70

75



aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized H chain
in V region

<400> 65

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80



Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 66

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d1" of humaniz
ed H chain V region

<400> 66

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10



cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
15 20 25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45

gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
50 55 60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
65 70 75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
80 85 90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d1" of humanized H cha



in V region

<400> 67

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 68

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHS

<400> 68

ttctatgcat tgggtgacaggccctgg acaagggtt gagtggattg gagggaaatga 60

tcctgcgaat ggccatctt

79



<210> 69

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2VHA

<400> 69

aagatggcca ttcgcaggat cattccctcc aatccactca agcccttgct caggggcctg 60

tcgcacccaa tgcatagaa 79

<210> 70

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b3" of humanized H chain V region

<400> 70

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5



gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn

65

70

75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile

80

85

90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 71

<211> 119

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b3" of humanized H chain in V region

<400> 71

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 72

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide



<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> Nucleotide sequence coding for version "d3" of humanized H chain V region

<400> 72

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp

50

55

60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

65

70

75



aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val

80

85

90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "d3" of humanized H chain
in V region

<400> 73

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80



Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 74

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv1S

<400> 74

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggtt 60

ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

<210> 75

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv4S

<400> 75

ttggcagatg ggggtccatc aaggttcagt ggctccgat ctggtaccga tttcactctc 60

accatctcga gtctgcaacc tgaagatttt gcaactta 98

<210> 76

<211> 98

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv2A

<400> 76

cttaagaagc ttttaatgtc ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca 60

gatgcagaca gggaggatgg agactgggtc atctggat 98

<210> 77

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv3A

<400> 77

gatgggaccc catctgcaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccct 60

ggtttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgtc 98

<210> 78

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling vector h5Lv5A

<400> 78

tgttcgtacg ttgatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtgtacggg ctctcaccat 60

gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

<210> 79

<211> 20

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvS

<400> 79

gtctagatct ccaccatgag

20

<210> 80

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer h5LvA

<400> 80

tgttcgtacg ttgatctc

19

<210> 81

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)... (381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "a" of humanize
d L chain V region

<400> 81



atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20 -15 -10 -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
1 5 10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
15 20 25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
30 35 40
aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
45 50 55 60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
80 85 90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105

<210> 82

<211> 107

<212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "a" of humanized L chain V region

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 83

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SS

<400> 83

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagatt ttgcaactta 60



ctattgtctg cagaaca

77

<210> 84

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3SA

<400> 84

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggt accagac 77

<210> 85

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RS

<400> 85

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctccag cctgaagata ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

<210> 86

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F3RA

<400> 86

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60



tgtaatcggg accagac

<210> 87

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)... (60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)... (381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b" of humanize
d L chain V region

<400> 87

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40



aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
45 50 55 60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
80 85 90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b" of humanized L chain V region

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45



Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 89

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "c" of humanize
d L chain V region

<400> 89

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20

-15

-10

-5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1

5

10

6 0 / 7 7



gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15

20

25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30

35

40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45

50

55

60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "c" of humanized L chain V region

<400> 90



Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 91

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2SS

<400> 91

gtctcttaag ttggttcag cagaaaccag ggaaatctcc taagaccctg atctactatg 60

caactagtaa ca 72

<210> 92

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> FR shuffling primer F2SA

<400> 92

tggttactagt tgcataatag atcagggtct taggagattt ccctgggttc tgctggaacc 60

aacttaagag ac 72

<210> 93

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XS

<400> 93

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtcctg atctattatg 60

caactagtaa ca 72

<210> 94

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FR shuffling primer F2XA

<400> 94

tggttactagt tgcataatag atcagggtct taggggcttt ctctgggttc tgctgatacc 60

aacttaagag ac 72

<210> 95

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b1" of humanized L chain V region

<400> 95

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro

30 35 40

aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75



agc ctc cag ccc gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80

85

90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b1" of humanized L chain
in V region

<400> 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95



Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 97

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> Nucleotide sequence coding for version "b2" of humanized L chain V region

<400> 97

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1

5

10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15

20

25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro

30

35

40



aag tcc ctg acc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240
Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
45 50 55 60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
80 85 90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105

<210> 98

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of version "b2" of humanized L chain
in V region

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45



Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 99

<211> 117

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 99

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg Pro Gly Ala

5

10

15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80



Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Amino acid sequence of L chain V region of anti TF mouse monoclonal antibody ATR-5

<400> 100

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

5

10

15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser

65

70

75

80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95



Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 101

<211> 780

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for soluble human TF

<400> 101

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa 240

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg 288

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60



aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca 366
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac 384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca 432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa 480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg 528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct 576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg 624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg 672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
180 185 190
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205



tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat 768

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp

210

215

220

gac gat aaa taa

780

Asp Asp Lys

225

<210> 102

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 102

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80



Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
180 185 190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
210 215 220

Asp Asp Lys
225

<210> 103
<211> 780
<212> DNA
<213> Homosapiens
<220>
<223> DNA coding for human TF
<400> 103



atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48
MET Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
-30 -25 -20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
-15 -10 -5 -1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
1 5 10 15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
20 25 30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa 240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
35 40 45

tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg 288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
50 55 60

aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca 336
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
65 70 75 80

ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac 384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
85 90 95

tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca 432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
100 105 110



att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa 480
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg 528
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct 576
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg 624
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg 672
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205
 tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa ata ttc tac atc att 768
 Cys MET Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile
 210 215 220
 gga gct gtg gta ttt gtg gtc atc atc ctt gtc atc atc ctg gct ata 816
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile
 225 230 235 240
 tct cta cac aag tgt aga aag gca gga gtg ggg cag agc tgg aag gag 864
 Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu
 245 250 255



aac tcc cca ctg aat gtt tca taa

888

Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser ***

260

<210> 104

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of soluble human TF

<400> 104

MET Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val

50

55

60

Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala

65

70

75

80

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn

85

90

95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr

100

105

110

7 6 / 7 7



Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu

115

120

125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg

130

135

140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu

165

170

175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val

180

185

190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

Cys MET Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile

210

215

220

Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile

225

230

235

240

Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu

245

250

255

Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser

260





European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application number

EP 88 30 1190

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 4)
X	THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 58, no. 1, January 1987, page 258, ref. no. 941; Stuttgart, DE T.S. EDGINGTON et al.: "Molecular cloning of human tissue factor cDNA" * Abstract *	1-3, 5, 12-16, 19, 20, 22	C 12 N 15/00 C 12 P 21/02 C 12 N 5/00 C 12 N 1/20 C 07 K 13/00
	--		
X,D	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 83, January 1986, Biochemistry, pages 299-302; Washington, US A. GUHA et al.: "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles" * Whole article *	1, 3	
	--		
P,X	FEDERATION PROCEEDINGS, vol. 46, no. 3, March 1, 1987, page 716, ref. no. 2338; Bethesda, US J.H. MORRISSEY et al.: "Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor" * Abstract *	1-3, 5, 12-16, 19, 20, 22	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 4) C 12 N
	--		
P,X	FEDERATION PROCEEDINGS, vol. 46, no. 6, May 1, 1987, page 2242, ref. no. 1846, Bethesda, US E.M. SCARPATI et al.: "Human tissue factor: Cona cloning, primary structure, and chromosome localization"		
The present search report has been drawn up for all claims		/./.	
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 27-06-1989	Examiner HUBER-MACK
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document</p>			



European Patent
Office

CLAIMS INCURRING FEES

The present European patent application comprised at the time of filing more than ten claims.

- ☐ All claims fees have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for all claims.
- ☐ Only part of the claims fees have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims and for those claims for which claims fees have been paid.
- namely claims:
- ☐ No claims fees have been paid within the prescribed time limit. The present European search report has been drawn up for the first ten claims.

X LACK OF UNITY OF INVENTION

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirement of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions.

namely:

1. Claims 1-9,12-27:
Tissue factor protein; DNA encoding it, expression vector comprising tissue factor DNA, cell transformed with said vector, process for producing tissue factor protein, pharmaceutical composition comprising tissue factor protein
2. Claims 10,11:
Tissue factor fusion protein

- ☒ All further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for all claims.
- ☐ Only part of the further search fees have been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the inventions in respect of which search fees have been paid.
- namely claims:
- ☐ None of the further search fees has been paid within the fixed time limit. The present European search report has been drawn up for those parts of the European patent application which relate to the invention first mentioned in the claims.
- namely claims:



EP 88 30 1190

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 4)
	* Abstract *	1-3, 5, 12-16, 19, 20, 22	
	--		
P, X	CELL. vol. 50, July 3, 1987, pages 129-135; Cambridge, US J.H. MORRISSEY et al.: "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade"		
	* Whole article *	1-3, 5, 12-16, 19, 20, 22	
	--		
P, X	BIOCHEMISTRY, vol. 26, no. 17, August 25, 1987, pages 5234-5238; Washington, US E.M. SCARPATI et al.: "Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene"		TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 4)
	* Whole article *	1-3, 5, 12-16, 19, 20, 22	
	--		
P, X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 84, no. 15, August 1987, pages 5148-5152; Washington, US E.K. SPICER et al.: "Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: Primary structure of the protein and cDNA"		
	* Whole article *	1-3, 12- 16, 19, 20	
The present search report has been drawn up for all claims ./. .			
Place of search		Date of completion of the search	Examiner
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</p> <p>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons</p> <p>& : member of the same patent family, corresponding document</p>			



EP 88 30 1190

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

- 3 -

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 4)
P,X	THROMBOSIS RESEARCH, vol. 48, no. 1, October 1987, pages 89-99; New York, US K.L. FISHER et al.: "Cloning and expression of human tissue factor cDNA" * Whole article *	1-3,5, 12-18, 20-24	
A	FEDERATION PROCEEDINGS, vol. 45, no. 6, May 1986, page 1639, ref.no. 927; Bethesda, US J.M. KITTLER et al.: "Identification of a cDNA clone for bovine tissue factor" * Abstract *	1,2,10, 12,13	
A,D	EP-A-0 139 416 (GENETECH INC.) * Page 20, lines 11-28; figure 1 *	11	
E	WO-A-88 09 817 (MOUNT SINAI SCHOOL) * Pages 36-39; example 8; claims *	1-5,10, 12-17, 19-23	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl. 4)
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search		Date of completion of the search	Examiner
<div>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</div> <div>X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document</div> <div>T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document</div>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. **PCT/US88/00998**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC (4): C07H 21/04; C12N 15/00; C07K 7/06, 7/08, 7/10, 13/00, 15/00; G01N 33/53; C12P 21/00, 21/02; A61K 39/00, 39/395; G01N 33/532											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;">U.S.</td> <td style="padding: 5px;"> 424/85; 435/7, 68, 70, 71, 91, 172.1-172.3, 243, 253, 320; 514/2, 8, 12-15, 322; 530/324-327, 381, 387, 536/27, 935, 8, 9, 11, 12 22, 95, 99-106; 436/501 </td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div> <p style="margin-top: 10px;">CA File: 1967-1988 BIOSIS File: 1967-1988</p>			Classification System	Classification Symbols	U.S.	424/85; 435/7, 68, 70, 71, 91, 172.1-172.3, 243, 253, 320; 514/2, 8, 12-15, 322; 530/324-327, 381, 387, 536/27, 935, 8, 9, 11, 12 22, 95, 99-106; 436/501					
Classification System	Classification Symbols										
U.S.	424/85; 435/7, 68, 70, 71, 91, 172.1-172.3, 243, 253, 320; 514/2, 8, 12-15, 322; 530/324-327, 381, 387, 536/27, 935, 8, 9, 11, 12 22, 95, 99-106; 436/501										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Category [*]</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; border-bottom: 1px solid black;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> A. GUHA ET AL, "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 83, pages 299-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document. </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> 1-38 and 42-58 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;"> G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See entire document. </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> 1-38 and 42-58 </td> </tr> </table>			Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	A. GUHA ET AL, "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 83, pages 299-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document.	1-38 and 42-58	Y	G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See entire document.	1-38 and 42-58
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³									
Y	A. GUHA ET AL, "Affinity purification of human tissue factor: Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 83, pages 299-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document.	1-38 and 42-58									
Y	G.J. BROZE, JR. ET AL, "Purification of human brain tissue factor", The Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See entire document.	1-38 and 42-58									
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>											
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 22 JUNE 1988 </td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 09 AUG 1988 </td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority ISA/US </td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer JAMES MARTINELLI </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 22 JUNE 1988	Date of Mailing of this International Search Report 09 AUG 1988	International Searching Authority ISA/US	Signature of Authorized Officer JAMES MARTINELLI					
Date of the Actual Completion of the International Search 22 JUNE 1988	Date of Mailing of this International Search Report 09 AUG 1988										
International Searching Authority ISA/US	Signature of Authorized Officer JAMES MARTINELLI										

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
Y	J.M. KITTLER ET AL, "Identification of a cDNA clone for bovine tissue factor", Federation Proceedings, Volume 45, page 1639, abstract no. 927, published May 1986 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1-38 and 42-58
X,P Y,P	E.M. SCARPATI ET AL, "Human tissue factor: cDNA cloning, primary structure, and chromosome localization", Federation, Proceedings, Volume 46, page 2242 abstract no. 1846, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1,11-14 and 17 <u>2-10,15</u> 16,18- 38 and 42-58
X,P Y,P	J.H. MORRISSEY ET AL, "Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor," Federation Proceedings, Volume 46, page 716, abstract no. 2338, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document.	1-5,11- 13 and 17 <u>6-10,</u> 14-16, 18-38 and 42-58
Y	S.D. CARSON ET AL, "Monoclonal antibodies against bovine tissue factor, which block interaction with factor VII _a ", Blood, Volume 66, pages 152-156, published July 1985 by the American Society of Hematology, Grune & Stratton, Inc. (Orlando, Fla., USA). See especially pages 152-155.	1-38 and 42-58
X,P Y,P	J.H. MORRISSEY ET AL, "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade", Cell, Volume 50, pages 129-135, published 3 July 1987 by Cell Press (Cambridge, Mass., USA). See entire document.	1-5, 11-13 and 17 <u>6-10,</u> 14-16 18-38, and 42-58



III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. 14
Y	R.H. AEBERSOLD ET AL, "Electroblotting onto activated glass", The Journal of Biological Chemistry, Volume 261, pages 4229-4238, published 25 March 1986 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See especially page 4229.	21-38, 42-48 and 53-58
Y,P	Chemical Abstracts, Volume 107, Number 17, issued 26 October 1987 (Columbus, Ohio, USA), S.D. CARSON ET. AL, "An inhibitory monoclonal antibody against human tissue factor", see page 539, the Abstract No. 152425h, Blood 1987, 70(2), 490-3(Eng.).	1-38 and 42-58
X,P Y,P	Chemical Abstracts, Volume 108, Number 9, issued 29 February 1988 (Columbus, Ohio, USA), K.L. FISHER ET AL, "Cloning and expression of human tissue factor cDNA", see pages 195-196, the Abstract No. 70091c, Thromb. Res. 1987, 48(1), 89-99(Eng.).	1,11-14 and 17 2-10, 15,16 18-38 and 42-58
Y	A. HINNEN ET AL, "Transformation of yeast", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 75, pages 1929-1933, published April 1978 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington D.C., USA). See especially page 1929.	1-38 and 42-58
Y	M. HOUGHTON ET AL, "The amino-terminal sequence of human fibroblast interferon as deduced from reverse transcripts obtained using synthetic oligonucleotide primers", Nucleic Acids Research Volume 8, Number 9, pages 1913-1931, published May 1980 by IRL Press Limited (Oxford, England). See page 1913.	1-38 and 42-58

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

X,P
Y,P

E.M. SCARPATI ET AL, "Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene", Bio-chemistry, Volume 26, pages 5234-5238, published 25 August 1987 by the American Chemical Society (Columbus, Ohio USA). See entire document.

1,11-14
and 17
2-10,15
16,
18-38,
and
42-58

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers _____, because they relate to subject matter ¹² not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claim numbers ³⁹⁻⁴¹ because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out ¹³, specifically:

Claim 39 recites "an antibody composition according to claim 22" while claim 22 is not directed to an antibody. Claim 40 depends from claim 39. Claim 41 recites a "polypeptide of claim 15" while claim 15 is directed to a DNA. Hence, each of the claims 39-41 is incomplete and unsearchable.

3. ☐ Claim numbers _____, because they are dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☒ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

I. Claims 1-20 and 42-52.

V. Claims 29-34, 36, 37
and 53-58.

II. Claims 21-24 and 38.

III. Claim 25.

IV. Claims 26-28 and 35.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

